



**Sara Raquel Gomes
Fernandes**

**Porfirinas expandidas: avaliação da eficiência em
aPDT**



**Sara Raquel Gomes
Fernandes**

**Porfirinas expandidas: avaliação da eficiência em
aPDT**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de Mestre em Biologia Aplicada, Ramo Microbiologia Clínica e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob a co-orientação científica do Doutor João Paulo Costa Tomé, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT no âmbito do projeto
PTDC/CTM/101538/2008, financiado pelo COMPETE e FEDER.



Este trabalho foi apoiado pelo Convénio de Cooperação FCT – DAAD “Métodos rápidos de avaliação de compostos tetrapirrólicos como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antimicrobiana” (2012-2013).

AOS MEUS PAIS.

A TI, CONSTANTE FONTE DE FORÇA.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino (arguente)

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha (orientadora)

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor João Paulo Costa Tomé (co-orientador)

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Professora Doutora Ângela Cunha, orientadora da tese, pelo profissionalismo, disponibilidade, paciência, dedicação, confiança e pelas palavras de incentivo.

Ao Doutor João Tomé, co-orientador da tese, pelo incentivo, sentido crítico e pelo voto de confiança.

À Professora Doutora Amparo Faustino por todas as sugestões, constante disponibilidade e dedicação, imutável apoio e pela aprendizagem transmitida.

À Sandra pela amizade, carinho, companheirismo, constante apoio, imutável incentivo, por todos os momentos que passámos no decorrer deste desafio sempre partilhado e por todos aqueles que ainda iremos passar.

À Clara por todo o ensinamento, paciência e pela ajuda ao longo da realização do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ambiental que se disponibilizaram para ajudar e que contribuíram para os bons momentos.

Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica que de alguma forma me ajudaram no decorrer do trabalho.

À Professora Doutora Paula Gonçalves e à Doutora Virgília Silva por toda a disponibilidade.

Aos amigos que me incentivam incondicionalmente e que acreditam sempre em mim.

Ao Sérgio por permanecer na minha vida com a mesma ternura com que nela entrou, por fazer parte de todos os momentos, por todo o amor, companheirismo, carinho e paciência.

Aos meus pais por mais este esforço, pela dedicação, motivação, confiança, expectativas depositadas em mim e pelo amor incondicional.

palavras-chave

Porfirinas expandidas, hexafirinas, terapia fotodinâmica, terapia fotodinâmica antimicrobiana, fotossensibilizadores.

resumo

Ao longo das últimas décadas, a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido adotada para o tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma abordagem não antibiótica para inativar microrganismos que envolve a interação de três elementos principais – um fotossensibilizador (PS), luz visível e oxigênio – da qual resulta a produção de espécies reativas de oxigênio que causam danos celulares letais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de novas porfirinas expandidas, a Hexa-SPy⁺-Me (mistura das formas catiónicas oxidada e reduzida de hexaiodeto 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil][26]hexafirina e hexaiodeto 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil][28]hexafirina), a 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(4-piridilsulfanil)fenil][26]hexafirina e a 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(4-piridilsulfanil)fenil][28]hexafirina como fotossensibilizadores na inativação da bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli* ATCC 13706, e Gram-positiva, *Staphylococcus* sp.. De forma a avaliar expeditamente o potencial dos novos compostos, foram realizados ensaios preliminares com uma estirpe recombinante de *Escherichia coli* bioluminescente. Para comparação, foram realizadas, paralelamente, experiências com dois PS catiónicos de referência: a tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina e a tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil]porfirina. Nos ensaios de fotoinativação foi testada a irradiação com luz branca e luz vermelha, com a intensidade de 150 mW cm⁻². Os novos compostos foram também caracterizados quanto à sua fotoestabilidade, produção de oxigênio singleto e solubilidade em água.

Os resultados mostram que as hexafirinas testadas não revelam potencial para aplicação como fotossensibilizadores em aPDT, uma vez que não causaram inativação de *Escherichia coli* ou *Staphylococcus* sp.. No entanto, provocaram o decaimento do difenilisobenzofurano usado para avaliar a produção de oxigênio singleto. A ausência de efeito fotodinâmico sobre os microrganismos testados pode estar relacionada com a baixa solubilidade dos compostos em água, com consequente agregação, ou com a reduzida afinidade para o material celular.

Estes compostos não revelam potencial para aplicação imediata em aPDT, podendo, no entanto, ser perspetivadas outras aplicações, nomeadamente, como agentes de contraste ou marcadores para métodos imagiológicos de diagnóstico.

keywords

Expanded porphyrins, hexaphyrins, photodynamic therapy, antimicrobial photodynamic therapy, photosensitizers.

abstract

Over the last decades, photodynamic therapy (PDT) has been adopted for the treatment of oncological and infectious diseases. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a non-antibiotic approach to inactivate microorganisms and involves an interaction between three main elements – a photosensitizers (PS), oxygen and visible light - which results in the production of reactive oxygen species that cause lethal cellular damage.

The aim of this study was to evaluate the efficiency of new expanded porphyrins, Hexa-SPy⁺-Me (mixture of the cationic oxidized and reduced forms of 10,15,20,25,30-hexakis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-methylpyridinium-4-ylsulfanyl)phenyl][26]hexaphyrin hexa-iodide and 10,15,20,25,30-hexakis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-methylpyridinium-4-ylsulfanyl)phenyl][28]hexaphyrin hexa-iodide), 5,10,15,20,25,30-hexakis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(4-pyridylsulfanyl)phenyl][26]hexaphyrin and 5,10,15,20,25,30-hexakis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(4-pyridylsulfanyl)phenyl][28]hexaphyrin, as PS for the inactivation of the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* ATCC 13706, and the Gram-positive bacteria, *Staphylococcus* sp.. Preliminary screening assays were conducted with a recombinant strain of bioluminescent *Escherichia coli*. In parallel, inactivation experiments were conducted with two reference photosensitizers, the porphyrins 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide and 5,10,15,20-tetrakis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-methylpyridinium-4-ylsulfanyl)phenyl] porphyrin tetra-iodide. Photoinactivation experiments were conducted with either white or red light, with 150 mW·cm⁻² intensity. The photophysical and photochemical characterization of the new molecules involved the assessment of photostability, singlet oxygen generation and water solubility.

The results indicate that the tested hexaphyrins are not of immediate interest for use as photosensitizers in aPDT, since inactivation of neither *Escherichia coli* nor *Staphylococcus* sp. was observed. However, qualitative assays reveal that these are efficient singlet oxygen generators. The lack of antimicrobial effect is most likely related to the low water solubility of the tested compounds, with consequent aggregation in aqueous media, or to the low affinity to cellular material. Other biomedical applications, such as contrasting agents or markers for diagnostic imaging may be explored.

Índice

1. Introdução	3
1.1. Perspetiva histórica da terapia fotodinâmica	3
1.2. Processos fotofísicos envolvidos na terapia fotodinâmica	6
1.3. Aplicações da terapia fotodinâmica	7
1.3.1. Terapia fotodinâmica antitumoral	8
1.3.2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana	10
1.3.3. Aplicações ambientais do efeito fotodinâmico	17
1.4. Fotossensibilizadores	18
1.4.1. Porfirinas	22
1.4.2. Porphirinas expandidas	23
1.4.2.1. Hexafirinas	25
2. Material e métodos	29
2.1. Fotossensibilizadores	29
2.2. Estirpes bacterianas e condições de crescimento	31
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> bioluminescente	31
2.2.2. <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Escherichia coli</i> ATCC 13706	31
2.3. Montagem experimental dos ensaios de aPDT	32
2.3.1. Condições de irradiação	33
2.3.2. Testes de <i>screening</i> com bioluminescência	33
2.3.3. Quantificação de unidades formadoras de colónias	33
2.3.4. Controlos	34
2.4. Estudo da fotoestabilidade das hexafirinas	34
2.5. Estudo da produção de oxigénio singleto das porfirinas e hexafirinas	35
2.6. Avaliação da solubilidade da hexafirina Hexa-SPy ⁺ -Me (PS 3) nas condições experimentais	35
3. Resultados	39
3.1. Ensaio de fotoinativação	39
3.1.1. Ensaio de <i>screening</i> com <i>Escherichia coli</i> bioluminescente	39
3.1.2. Experiências de inativação com os fotossensibilizadores de referência	42
3.1.3. Experiências de inativação com hexafirinas catiónicas	43
3.2. Fotoestabilidade das hexafirinas	46
3.3. Produção de oxigénio singleto	49
3.4. Estudo da agregação do PS 3	50
4. Discussão	53
5. Conclusão	59
Referências	63

Lista de Abreviaturas

ALA	ácido 5-aminolevulínico
aPDT	terapia fotodinâmica antimicrobiana
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DPiBF	1,3-difenilisobenzofurano
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Hp	hematoporfirina
HpD	derivado de hematoporfirina
IgG	Imunoglobulina G
LEDs	díodos emissores de luz
LPS	lipopolissacáridos
Log	logaritmo de base 10
LB	Luria broth
NIR	região do infravermelho próximo
PBS	tampão fosfato salino
PDT	terapia fotodinâmica
PpIX	protoporfirina IX
PS	fotossensibilizador
¹ PS*	fotossensibilizador no estado singleto excitado
³ PS*	fotossensibilizador no estado tripleto excitado
ROS	espécies reativas de oxigênio
TSA	<i>tryptic soy agar</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
UFC	unidades formadoras de colônias
UV-vis	ultravioleta-visível

1. Introdução

1.1. Perspetiva histórica da terapia fotodinâmica

As propriedades curativas da luz – fenómeno ao qual os gregos chamaram primordialmente de “helioterapia” – foram descobertas há muitos milhares de anos atrás (Allison et al., 2004b). As antigas culturas egípcia, indiana e chinesa utilizaram o efeito terapêutico do sol para tratar uma variedade de doenças, incluindo, vitiligo, psoríase, cancro, psicose (Moan e Peg, 2003; Mitton et al., 2005; Mitton et al., 2008) e raquitismo (Yano et al., 2011). O sol foi a fonte de luz originalmente usada na terapia baseada na luz. Embora este se mostre uma fonte bastante poderosa (1000 W/m^2) e com um espectro multi-gama, não é necessariamente ideal nem conveniente (Allison et al., 2004b).

O médico dinamarquês Niels Finsen, em 1903, foi agraciado com o Prémio Nobel e o seu trabalho representa a fase moderna das aplicações terapêuticas da luz nomeadamente no tratamento da varíola e da tuberculose (Allison et al., 2004b; Mitton et al., 2005; Mitton et al., 2008).

Ao mesmo tempo, Oscar Raab, aluno de doutoramento de Hermann von Tappeiner, aquando da sua investigação sobre os efeitos tóxicos do corante laranja de acridina em *Paramecium caudatum*, realizou uma experiência durante uma tempestade, com condições de iluminação fora do comum. Descobriu que o laranja de acridina combinado com a luz era letal para as paramécias (Jori et al., 2006; Babilas et al., 2010). Numa série de experiências sucessivas, Raab comprovou que o efeito da conjugação destes fatores – luz e corante – era muito mais intenso do que os efeitos separados (Mitton et al., 2005; Mitton et al., 2008), e que a toxicidade do laranja de acridina nos protozoários não só era dependente da concentração do corante, mas também da intensidade da iluminação (Babilas et al., 2010). Com estas descobertas e após demonstrarem que o oxigénio era determinante nas reações de fotossensibilização, von Tappeiner e Jodlbauer, em 1907, propuseram a expressão “efeito fotodinâmico” (Mitton et al., 2005).

Estudos subsequentes permitiram concluir que o efeito fotodinâmico depende da interação de três fatores: um agente fotossensibilizador (PS), oxigénio e luz (Mitton et al., 2005; Mitton et al., 2008). Da reação resultam espécies reativas de oxigénio (ROS) que causam danos nos tecidos e nas células e consequentemente a sua destruição (Dougherty et al., 1998).

As primeiras fontes de luz usadas eram fontes incoerentes, como as lâmpadas de arco, que geravam muito calor, proporcionavam baixa intensidade luminosa e podiam tornar-se perigosas, para além de ser difícil o controlo da dose de luz. A aplicação de projetores de diapositivos com filtros para determinados comprimentos de onda constituiu um avanço (Huang, 2005). O uso de lasers, com os quais é possível aplicar um comprimento de onda muito preciso e feixes altamente focados abriu novas perspectivas à terapia fotodinâmica (PDT) (Allison et al., 2004b). As fontes de luz *não-laser*, tais como díodos emissores de luz (LEDs) têm tido, mais recentemente, um grande impacto na PDT, uma vez que são fontes de luz muito mais baratas, pequenas, leves e altamente flexíveis (Mitton et al., 2008). O desenvolvimento de fibras óticas veio permitir que as fontes de luz pudessem ser usadas numa gama mais larga de casos clínicos, uma vez que são capazes de encaixar em endoscópios ou em agulhas de biópsia (Allison et al., 2004b).

Em 1913, Meyer-Betz injetou-se a si próprio com uma dose significativa – 200 mg – de hematoporfirina (Hp) e expôs-se intencionalmente à luz para testar a reação no organismo (Allison et al., 2004b). Dor prolongada, edema, inchaço e hiperpigmentação nas zonas expostas à luz durante vários meses foram alguns dos sintomas descritos e o interesse clínico das porfirinas diminuiu durante as décadas seguintes (Figura 1.1) (Moan e Peg, 2003; Allison et al., 2004b; Mitton et al., 2008).

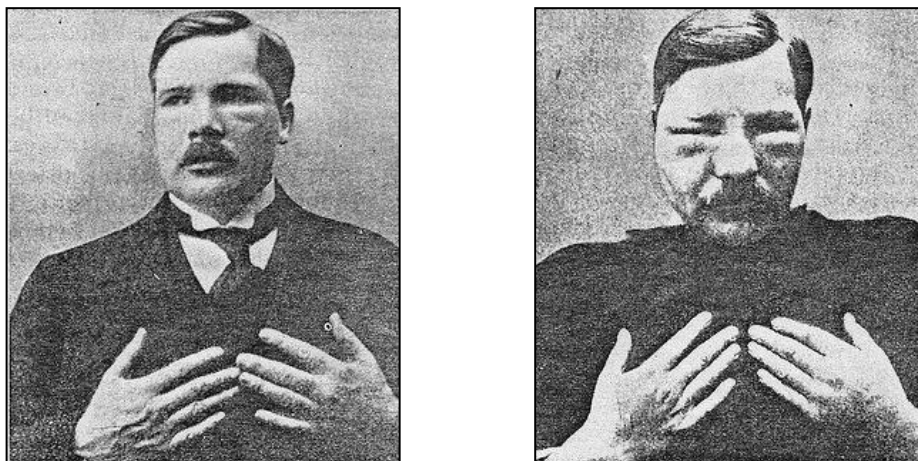


Figura 1.1: Meyer-Betz antes (à esquerda) e depois (à direita) da injeção de hematoporfirina e posterior exposição à luz (adaptado de <http://www.photobiology.info/Photomed.html>).

Os estudos de Lipson e Schwartz, em 1960, envolvendo a injeção de preparações contendo hematoporfirina para visualização, por fluorescência, de lesões neoplásicas durante uma cirurgia, marcaram o início da era atual da PDT (Dougherty et al., 1998).

Apesar do interesse inicial a PDT, também designada por *terapia por fotoradiação*, *fototerapia*, ou *fotoquimioterapia* (Konopka e Goslinski, 2007), só se desenvolveu como

modalidade terapêutica ao longo das últimas décadas, sendo cada vez mais adotada para o tratamento de doenças oncológicas por todo o mundo, nomeadamente na Europa, Japão, Canadá e nos Estados Unidos da América. Mais recentemente, o seu uso alargou-se ao tratamento de doenças não oncológicas, designadamente patologias de natureza infecciosa (Mitton et al., 2005; Jori et al., 2006; Mitton et al., 2008).

Desde que se tentaram as primeiras aplicações terapêuticas do efeito fotodinâmico até ao presente, uma grande variedade de substâncias tem sido utilizada como fotossensibilizadores (Allison et al., 2004b). No início do século passado, a eosina e a eritrosina foram os corantes utilizados por Georges Dreyer, na Dinamarca e Albert Jesionek, na Alemanha, como fotossensibilizadores tópicos para o tratamento de doenças como sífilis, lúpus vulgaris, pitíriase versicolor, psoríase, molusco contagioso e cancro de pele. No entanto, estas experiências foram abandonadas devido aos graves efeitos secundários observados, nomeadamente dor e necrose inespecífica dos tecidos profundos (Babilas et al., 2010).

Um dos marcos mais importantes na história da PDT foi a descoberta das porfirinas como agentes fotossensibilizadores, que decorreu da descoberta da uroporfirina, porfirina excretada na urina de doentes com porfíria. Estes doentes produzem fotossensibilizadores endógenos sendo portanto sensíveis ao sol (Allison et al., 2004b). A descoberta da hematoporfirina foi um outro marco importante. Este composto foi produzido pela primeira vez, ainda que numa forma impura, em 1841, quando Scherer isolou um precipitado, após aquecimento do sangue com ácido sulfúrico, que foi depois lavado, libertando o ferro, e em seguida tratado com álcool (Mitton et al., 2008). Passadas três décadas este precipitado foi designado como hematoporfirina, sendo também descritas as propriedades fotofísicas desta substância vermelha (Moan e Peg, 2003; Mitton et al., 2008).

Do tratamento da Hp com ácido acético e ácido sulfúrico obteve-se uma mistura de porfirinas, formalmente denominada por derivado de hematoporfirina (HpD), que demonstrou ter uma maior afinidade para o tecido tumoral e maior fototoxicidade do que a Hp (Dougherty et al., 1998). No entanto, a HpD tem como inconveniente provocar a fotossensibilização prolongada da pele (Babilas et al., 2010). A purificação da HpD conduziu ao primeiro fotossensibilizador aprovado para uso clínico, o Photofrin® (Huang, 2005). No entanto, o desenvolvimento de fotossensibilizadores que satisfaçam os requisitos e a especificidade de cada tipo de aplicação na PDT continua a ser um campo de intensa investigação (Yano et al., 2011).

1.2. Processos fotofísicos envolvidos na terapia fotodinâmica

O efeito fotodinâmico resulta de três elementos principais – PS, luz visível e oxigênio – de cuja interação resulta a produção de espécies fortemente oxidantes (Figura 1.2).

O PS no estado fundamental possui todos os seus elétrons emparelhados em orbitais de baixa energia. Após a aplicação da luz, o PS absorve um fóton, passando ao estado singlete excitado ($^1\text{PS}^*$) extremamente instável, de curta duração (0,04 μs) e com curto raio de ação (0,02 μm) (Hopper, 2000). Por fluorescência, o $^1\text{PS}^*$ pode regressar ao estado de energia mais baixo, o estado fundamental, ou em vez disso, por cruzamento intersistema, originar um estado tripleto excitado menos energético ($^3\text{PS}^*$) mas com um tempo de vida consideravelmente mais longo do que o estado singlete excitado. Consequentemente, o elétron excitado do PS no estado tripleto pode reorientar o seu *spin* (um processo relativamente lento) e, em seguida, regressar ao estado fundamental emitindo luz (fosforescência), ou então interagir com moléculas existente na sua proximidade. O PS tripleto ($^3\text{PS}^*$) pode reagir facilmente com o oxigênio molecular (tripleto no seu estado fundamental - $^3\text{O}_2$) ou com outras moléculas, seguindo duas vias, designadas como *via* tipo I e tipo II (Denis et al., 2011).

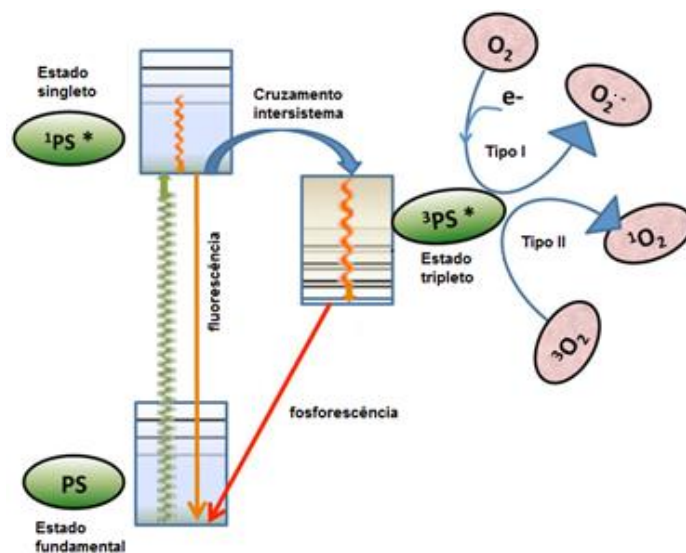


Figura 1.2: Representação esquemática dos mecanismos fotoquímicos da PDT (adaptado de Kharkwal et al., 2011).

A *via* tipo I envolve transferência de elétrons ou de um átomo de hidrogênio entre o $^3\text{PS}^*$ e moléculas de substrato, tais como a membrana celular, produzindo espécies radicalares e/ou radicais livres (Yano et al., 2011). Estas, por sua vez interagem com o

oxigénio molecular para produzir espécies de oxigénio altamente reativas (ROS), tais como o ião superóxido, radicais hidroxilo, e peróxido de hidrogénio, que são prejudiciais para a integridade das células alvo e lhes provocam danos biológicos irreparáveis (Rajesh et al., 2011).

A *vía* tipo II é definida pela interação entre o fotossensibilizador no estado tripleto excitado e o oxigénio molecular no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), produzindo um estado de oxigénio eletronicamente excitado e altamente reativo, o oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$). Este reage quimicamente com muitas moléculas biológicas, incluindo lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, levando à morte das células alvo (Rajesh et al., 2011; Yano et al., 2011). O oxigénio singleto é assim considerado como a principal espécie citotóxica durante o processo fotodinâmico (Yano et al., 2011).

O fotossensibilizador funciona como catalisador deste processo necessitando que os outros componentes essenciais (luz e oxigénio) estejam presentes para se manter ativo e poder atuar em vários ciclos de produção de oxigénio singleto (Brown et al., 2004).

1.3. Aplicações da terapia fotodinâmica

Atualmente, o efeito fotodinâmico tem aplicações na inativação de células em contextos clínico e ambiental. Na área clínica, a terapia antitumoral, como alternativa à quimioterapia e à radioterapia, e a terapia antimicrobiana são dois grandes campos de aplicação. Além destas, a PDT tem sido aplicada, ou encontra-se em estudos experimentais, noutras áreas clínicas não oncológicas, como por exemplo a purificação de sangue nos bancos de armazenamento, no tratamento da degeneração macular da retina ou no tratamento da acne (Tabela 1.1) (Kalka et al., 2000; Sibata et al., 2000; Häder e Jori, 2003; Meisel and Kocher, 2005; Babilas et al., 2010; Yano et al., 2011).

Tabela 1.1: Algumas aplicações clínicas do efeito fotodinâmico.

Dermatologia	Acne vulgar; esclerodermia localizada; psoríase; queratose actínica.
Ginecologia	Verrugas genitais.
Oftalmologia	Degeneração macular da retina.
Reumatologia	Artrite reumatoide.
Microbiologia	Infeções pelo vírus humano herpes simplex; infeções periodontais.
Cardiologia	Aterosclerose.
Oncologia	Cancros do esófago, pulmão, pele, cabeça e pescoço, mama.

1.3.1. Terapia fotodinâmica antitumoral

Desde há 25 anos que a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido uma ferramenta útil em oncologia, mas só após a descoberta de agentes fotossensibilizadores eficientes e dispositivos adequados para a aplicação de luz, é que esta forma de tratamento está a ser usada mais amplamente como uma opção clínica viável para o tratamento de diversos tipos de tumores. Há evidências de que as taxas de resposta e a durabilidade das respostas são tão boas ou melhores do que as terapias usadas convencionalmente (Hopper, 2000).

A PDT usa vários mecanismos diferentes para destruir tumores. As respostas variam com o tipo de células tumorais e com o seu potencial genético e metabólico, bem como com o tipo de fotossensibilizador e a sua localização subcelular. Um fotossensibilizador pode ter como alvo células tumorais diretamente, induzindo necrose ou apoptose (Oleinick et al., 2002). Em alternativa, pelo direcionamento da vascularização tumoral (ou mesmo da vascularização saudável circundante), o tumor pode ser privado do oxigénio transportado pelo sangue e assim, em conjunto com a resposta inflamatória e imunitária, podem ser maximizados os danos no tumor através do uso da PDT (Henderson e Dougherty, 1992).

Fisiologicamente os tumores, comparativamente aos tecidos normais, apresentam características diferenciadoras, designadamente, maior volume intersticial, maior fração de macrófagos, “fuga” de microvascularização, drenagem linfática pobre, pH extracelular baixo, quantidade relativamente grande de colagénio sintetizado de novo e maior número de recetores para lipoproteínas (Moan e Peg, 2003; Brown et al., 2004). Estas características do tecido tumoral favorecem a interação com os fotossensibilizadores, fazendo com que se acumulem seletivamente nos tecidos tumorais em relação ao tecido saudável circundante (Dougherty et al., 1998).

Nos últimos 10 anos, têm sido feitos avanços consideráveis na compreensão do comportamento da luz nos tecidos humanos e no desenvolvimento de equipamento para a administração de luz em PDT. Hoje em dia, poucos são os casos em que um tumor (interno e externo) não pode ser iluminado e ser-lhe administrada uma dada dose de luz pré-determinada de comprimento de onda adequado (Ochsner, 1996; Brancalion e Moseley, 2002). O protocolo típico de um tratamento de PDT começa pela administração de uma determinada dose de fotossensibilizador (por via sistémica ou cutânea) a um dado paciente. Depois de um intervalo de tempo apropriado, o fotossensibilizador acumula-se preferencialmente no tumor e procede-se à irradiação do local com luz de comprimento de

onda adequado (Yano et al., 2011). A PDT induz a necrose e/ou apoptose de células tumorais pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Yano et al., 2011). A destruição das células tumorais manifesta-se pelo inchaço e formação de tecido necrótico. O tempo dos tratamentos pode variar substancialmente, e está relacionado com a absorção de luz pelo PS e a eficiência da transferência de energia da luz para o oxigênio. A duração de um tratamento típico com fotossensibilizadores de primeira geração é de cerca de 1000 segundos, enquanto os fotossensibilizadores mais recentes podem induzir a morte celular eficaz em 200 segundos usando como fonte de luz lasers de baixa energia (Hopper, 2000).

Relativamente às terapias convencionais, a baixa morbidade e a insignificante perturbação funcional que resultam do tratamento constituem a principal vantagem da terapia fotodinâmica no tratamento de situações malignas e pré-malignas (Hopper, 2000) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Vantagens da terapia fotodinâmica sobre as terapias convencionais antitumorais (Konopka e Goslinski, 2007).

<ul style="list-style-type: none"> • Método não invasivo e conveniente para o paciente;
<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser realizada em regime de ambulatório ou em “hospital de dia”;
<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser dirigida precisamente e seletivamente em doenças localizadas;
<ul style="list-style-type: none"> • Embora não se possa curar a doença disseminada avançada, porque a iluminação do corpo todo não é possível, pode melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência;
<ul style="list-style-type: none"> • Podem ser administradas doses repetidas sem a necessidade de limitar o total de doses;
<ul style="list-style-type: none"> • Os efeitos secundários são moderados;
<ul style="list-style-type: none"> • Pode ter excelentes resultados cosméticos, e o processo de cicatrização resulta em pouca ou nenhuma cicatriz;
<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser aplicada em todo o mundo com investimentos em infraestruturas relativamente baixos.

Das vantagens da PDT sobre os tratamentos convencionais, resumidas na Tabela 1.2 (Konopka e Goslinski, 2007), salienta-se a reduzida capacidade de invasão e a destruição seletiva do tumor, com a conservação dos tecidos saudáveis circundantes. Além disto, a cura do tecido saudável depois da PDT é muito eficiente, normalmente sem cicatrizes (Figura 1.3) mesmo que o tecido circundante seja danificado na altura do tratamento (Brown et al., 2004). O facto de a PDT ser um processo fotoquímico frio, faz com que não haja aquecimento do tecido, e assim, tecido conjuntivo como colagénio e elastina são pouco afetados. Existe, portanto, muito menos risco para a integridade das

estruturas subjacentes que as associadas às técnicas térmicas a laser e cirurgia (Hopper, 2000). A PDT pode ainda ser aplicada em combinação com qualquer um dos tratamentos convencionais, o que se torna mais uma vantagem (Biel, 2002).



Figura 1.3: Paciente com a doença de Bowen, (A) antes, e (B) dois meses após PDT como tratamento (Brown et al., 2004).

No entanto, a simplicidade clínica da PDT não evita algumas desvantagens, que por vezes limitam o uso mais frequente desta forma de terapia. Mesmo os melhores fotossensibilizadores atualmente disponíveis são passíveis de se acumularem sistemicamente até um certo grau, noutros órgãos, particularmente na pele, causando fotossensibilidade cutânea prolongada. São também conhecidos casos de respostas imunes locais e sistêmicas (Dougherty et al., 1998) e apesar de ser um tratamento geralmente bem tolerado, a dor pode ser um fator limitante (Ibbotson, 2011).

1.3.2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana

O uso de antibióticos para a destruição de microrganismos foi um dos maiores avanços na medicina do século XX. Chegou mesmo a supor-se que as infeções deixariam de constituir um problema para a saúde humana. No entanto, a emergência de resistência aos antibióticos constitui atualmente uma nova preocupação e pode vir a ditar o fim da chamada “era dos antibióticos” (Dai et al., 2009).

É conhecido desde os primórdios da PDT, no início do século passado, que certos microrganismos podem ser mortos pela combinação *in vitro* de corantes e luz (Moan e Peng, 2003). Nas últimas décadas, tem crescido o conhecimento sobre a inativação de microrganismos por várias combinações de PS e luz (Hamblin e Hasan, 2004).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), também conhecida como *inativação fotodinâmica* (PDI), *fotossensibilização letal*, *desinfecção fotoativada* (PAD) ou *quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana* (PACT) (Kharkwal et al., 2011), é uma abordagem não antibiótica para inativar microrganismos. Esta nova metodologia é uma alternativa potencial aos antibióticos convencionais e já provou ser eficaz *in vitro* contra bactérias, vírus, fungos e protozoários (Almeida et al., 2011).

O mecanismo geral de fotossensibilização de bactérias, fungos e protozoários encontra-se esquematizado na Figura 1.4. A via de fotossensibilização I, que envolve uma translocação direta do fotossensibilizador para a membrana plasmática, é referente para bactérias Gram-positivas e protozoários na fase de trofozoíto. A via de fotossensibilização II, em que é necessário um aumento inicial na permeabilidade da parede exterior, é característica das bactérias Gram-negativas, fungos e protozoários na fase quística (Jori et al., 2006).

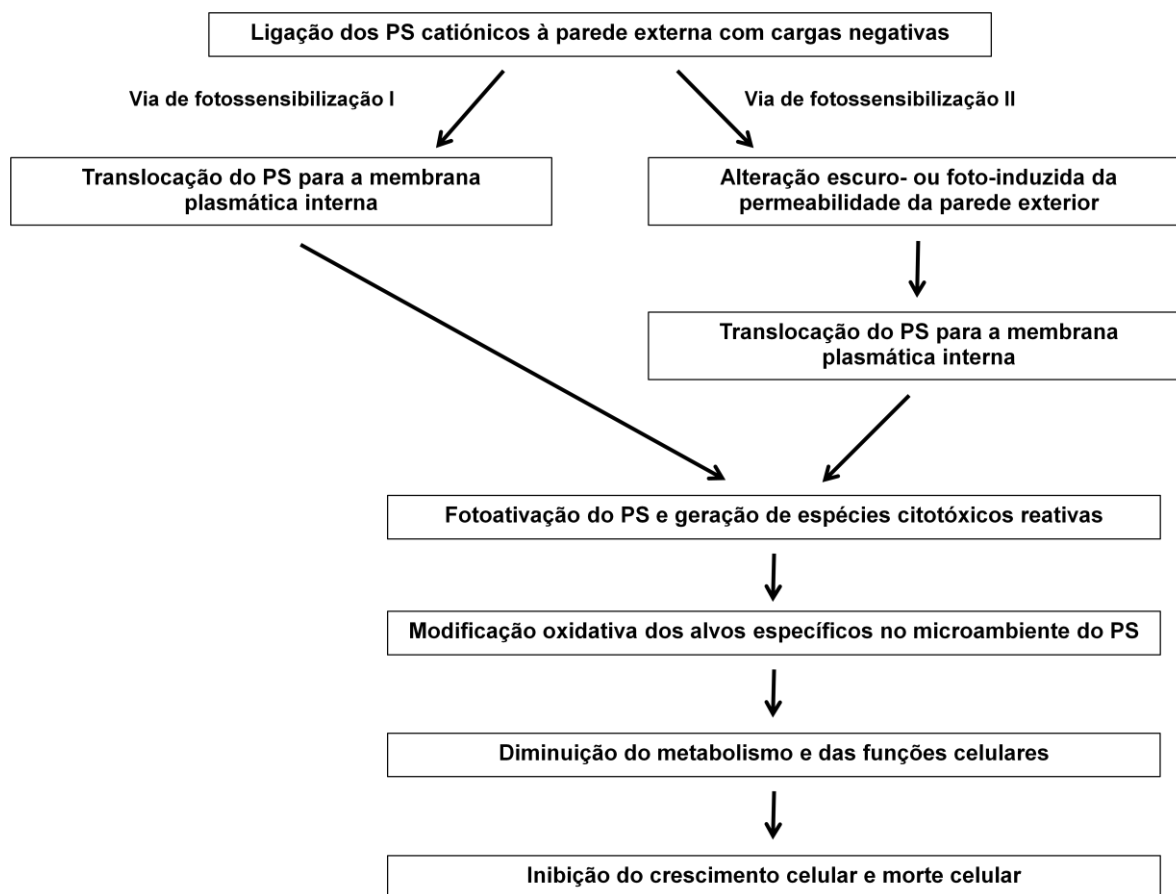


Figura 1.4: Esquema ilustrativo dos passos essenciais envolvidos no processo de fotossensibilização de células microbianas e subsequente fotoinativação (Jori et al., 2006).

Como na maioria dos microrganismos os principais alvos da aPDT são as estruturas externas, o PS não precisa de entrar para o compartimento intracelular (Preuß

et al., 2012). Uma adesão específica e adequada a essas estruturas é suficiente para a sua destruição ativada pela luz. Assim, são reduzidas as possibilidades de desenvolvimento de resistência por estratégias como o bloqueio da absorção, aumento da desintoxicação metabólica ou pelo aumento da exportação da droga (Almeida et al., 2011). Estudos de microscopia de fluorescência realizados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em protozoários demonstram que o fotossensibilizador se localiza preferencialmente ao nível da membrana plasmática antes da irradiação e que se difunde para o interior da célula apenas após exposição à luz, com diminuição significativa da sobrevivência (Jori et al., 2006; Preuß et al., 2012). Assim, os principais alvos da atividade fotodinâmica antibacteriana e antiviral são as estruturas microbianas externas, como paredes celulares, membranas celulares, proteínas da cápside e envelopes lipídicos. Alguns danos produzidos ao nível dos ácidos nucleicos podem ser reparados pela ação dos sistemas de reparação do DNA (Allen et al., 1995; Merchat et al., 1996; Käsermann e Kempf, 1997; Gábor et al., 2001; Vzorov et al., 2002; Egyeki et al., 2003; Hamblin e Hasan, 2004; Zupán et al., 2008). No entanto, embora ocorram, os danos nos ácidos nucleicos, não são a principal causa de inativação fotodinâmica microbiana, o que concorda com a ausência de efeitos mutagénicos (Imray e MacPhee, 1973; Jori et al., 2011).

Todos os estudos que examinaram a morte de bactérias resistentes aos antibióticos por aPDT descobriram que elas são tão, ou mais, suscetíveis que as suas homólogas selvagens (Tang et al., 2007; Maisch, 2009). Além disso, não tem até agora sido possível induzir artificialmente a resistência à aPDT em qualquer microrganismo testado (Lauro et al., 2002).

A fotoinativação de fungos é menos dependente da ligação do PS à célula e os alvos são muito mais complexos do que nas bactérias. O PS livre induz algumas alterações iniciais funcionais na membrana citoplasmática, que permitem a sua penetração com uma fotoinativação subcelular mais extensiva, tendo alvos como a mitocôndria ou o núcleo (Bertoloni et al., 1987; Kassab et al., 2003).

A aPDT clínica abrange áreas diversas, designadamente a odontologia (em tratamentos de infeções dos dentes e das mucosas e na eliminação de biofilmes orais), dermatologia (tratamento de impetigo, dermatite atópica, acne vulgar e onicomicoses), gastroenterologia (tratamento de infeções do estômago causadas por *Helicobacter pylori*) e descontaminação de sangue e derivados, entre outras (Figura 1.5) (Maisch et al., 2004; Donnelly et al., 2005; Hamblin et al., 2005; Konopka e Goslinski, 2007; Dai et al., 2009).

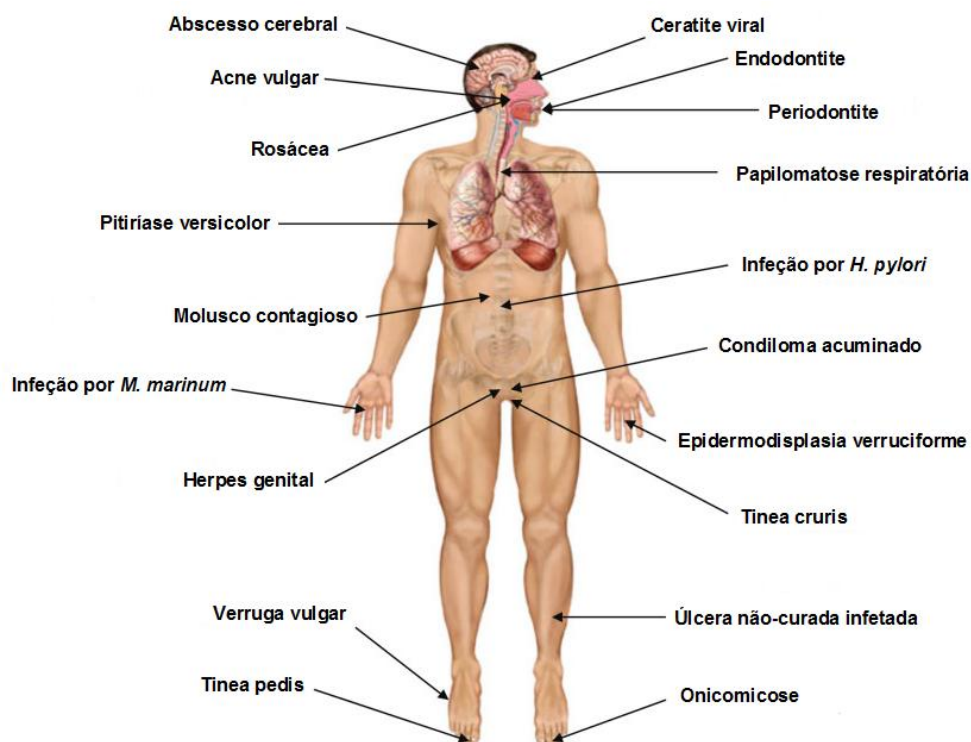


Figura 1.5: Representação esquemática das infecções humanas tratadas clinicamente por aPDT (adaptado de Kharkwal et al., 2011).

Apesar das infecções dos tecidos moles serem relativamente raras, podem ter consequências devastadoras para os pacientes. Nestas infecções a aPDT tópica pode contribuir para a rápida redução da carga bacteriana e, consequentemente, reduzir as excisões cirúrgicas repetidas (Dai et al., 2009). A adição de ácido 5-aminolevulínico (ALA) a tecidos infetados com vírus pode resultar, sob condições adequadas, numa acumulação de protoporfirina IX (PpIX) nas células. A subsequente exposição à luz vermelha resulta numa drástica redução da infetividade do vírus. Quando adequadamente feita, a aPDT com ALA pode tratar lesões virais, sendo exemplos as verrugas vulgares das mãos (Figura 1.6) e o molusco contagioso em pacientes com SIDA (Smetana et al., 1997).

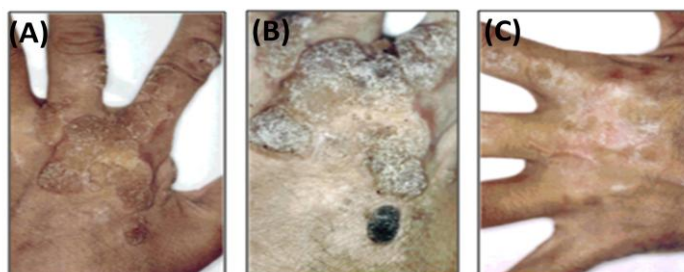


Figura 1.6: **A** - Verrugas vulgares de mãos; **B** – Aspecto da zona afetada sete dias após a PDT com ALA (formação de crosta); **C** – Aspecto da zona afetada um mês após o tratamento (adaptado de Smetana et al., 1997).

O tratamento de infecções bacterianas intracelulares é um desafio médico uma vez que os microrganismos ficam protegidos no meio intracelular de muitos mecanismos de defesa humoral e celular. A sua localização intracelular garante-lhes assim menos exposição aos agentes quimioterapêuticos. Apesar das investigações neste campo estarem ainda no início, a aPDT é cada vez mais uma alternativa a considerar (Akilov et al., 2006).

Os protocolos de inativação, o tipo de fotossensibilizadores e, em última instância, a eficiência do tratamento, variam largamente entre os diferentes microrganismos-alvo.

Os fotossensibilizadores neutros, aniônicos ou catiónicos são eficazes contra bactérias Gram-positivas, enquanto apenas os PS catiónicos, ou o uso de estratégias que permeabilizam a barreira das Gram-negativas em combinação com PS não-catiônicos, têm sucesso na inativação de bactérias Gram-negativas. Estas diferenças na suscetibilidade entre as espécies bacterianas são explicadas pela sua estrutura e pela composição química, grau de complexidade e permeabilidade da parede celular (Minnock et al., 2000).

Algumas bactérias possuem pigmentos naturais que no caso de se tratar de porfirinas, podem atuar como um fotossensibilizador natural. Este é o caso de *Propionibacterium acnes* e *Helicobacter pylori*, entre outros, que acumulam porfirinas e que permitem a sua inativação fotodinâmica sem a necessidade de adição de PS exógeno (Demidova e Hamblin, 2004).

Alguns PS catiónicos apresentam seletividade para células microbianas em comparação com as células de mamíferos. Pensa-se que as moléculas catiónicas são lentamente absorvidas pelas células do hospedeiro por endocitose, enquanto que a sua ligação às células bacterianas é muito mais rápida. Assim, se a iluminação for feita logo após a aplicação do PS, os danos da aPDT para os tecidos serão minimizados (Demidova e Hamblin, 2004). A ligação entre células microbianas e PS catiónicos ou conjugados polímero-PS envolve uma "absorção autopromovida". Numa fase inicial as moléculas catiónicas deslocam cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , na membrana externa, em pontos onde eles agem como uma âncora para as moléculas de lipopolissacáridos (LPS), carregadas negativamente. A membrana externa assim enfraquecida torna-se ligeiramente mais permeável e permite maior acesso ao PS catiónico. Assim, quanto maior a desorganização da barreira de permeabilidade maior a absorção do PS (Minnock et al., 2000). A inativação fotodinâmica das bactérias Gram-negativas pode ser melhorada através da adição de moléculas biológicas ou químicas, como por exemplo o nonapéptido polimixina ou Tris-EDTA, que são conhecidos por modificar a consistência nativa da

membrana externa, melhorando assim a sua permeabilidade e facilitando a penetração das moléculas fototóxicas na membrana citoplasmática (Maisch et al., 2004). A destabilização da membrana por adição de Tris-EDTA antes da fotossensibilização também aumenta a eficiência da inativação fotodinâmica de bactérias Gram-negativas (Merchat et al., 1996).

Para além de bactérias, a aPDT tem sido dirigida para muitos outros microrganismos patogénicos. Leveduras e fungos têm sido eficientemente inativados em experiências *in vitro* (Hamblin e Hansan, 2004). Apesar do número crescente de resultados promissores em culturas de células, apenas recentemente um pequeno número de artigos relatou resultados da fotossensibilização *in vivo* de micoses em animais de laboratório e humanos (Calzavara-Pinton et al., 2005). A lista de fungos inativados pela aPDT inclui: *Trychophyton mentagrophytes*, *Trychophyton tonsurans*, *Microsporum cookei*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Nannizia cajetani*, *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium* sp. (Denis et al., 2011).

A parede celular fúngica é constituída por uma camada espessa de beta-glucano e quitina, que proporciona uma barreira de permeabilidade intermediária entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Dai et al., 2009). Tal como nas bactérias, têm sido aplicadas diferentes estratégias de permeabilização que passam pela utilização de PS em combinação com um agente de permeabilização, designadamente o nonapéptido polimixina (Nitzan et al., 1992) ou EDTA (Valduga et al., 1993). Um estudo sobre a relação entre a inativação fotodinâmica de leveduras e a integridade da parede celular demonstrou que *Cryptococcus neoformans*, uma levedura encapsulada causadora de criptococose, é suscetível à aPDT com utilização de um conjugado policatiónico de polietilenoimina e o fotossensibilizador clorina (e6) (Fuchs et al., 2007).

De referir que os PS com carga positiva, são também eficazes contra fungos (Tegos et al., 2005; Gomes et al., 2011), vírus (Rywkin et al., 1994), parasitas (Kassab et al., 2002), incluindo as formas esporuladas altamente resistentes (Demidova e Hamblin, 2005).

Embora algumas aplicações clínicas da aPDT tenham sido dirigidas a lesões de etiologia viral, a maior parte dos trabalhos realizados com vírus tem sido orientada para a esterilização de sangue e hemoderivados. Várias conclusões apontam que os vírus com invólucro lipídico são mais suscetíveis à aPDT do que as estirpes sem invólucro (Hamblin e Hansan, 2004).

Os parasitas patogênicos humanos são também suscetíveis de ser inativados pela combinação de diferentes PS e luz. Foi já demonstrada a inativação por aPDT de *Plasmodium falciparum*, responsável pela malária, com ftalocianinas de silício. O parasita causador da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, é igualmente sensível à luz na presença de hematoporfirina ou ftalocianinas de alumínio sulfonadas (Hamblin e Hansan, 2004). Muito recentemente, têm sido conseguidos resultados bastante promissores no que diz respeito ao tratamento da leishmaniose (Akilov et al., 2006), cuja forma mais comum é a leishmaniose cutânea. Tratamentos de 1 a 28 ciclos, durante 16 semanas, com 10% de ALA ou Metvix aplicado topicamente e usando luz vermelha (570-670 nm, 75-150 J/cm²) mostraram-se mais eficazes do que a aplicação tópica de paromomicina, sendo obtido um efeito parasiticida suficiente e um resultado estético excelente (Akilov et al., 2006; Kharkwal et al., 2011).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana apresenta ainda outras vantagens relativamente à quimioterapia antimicrobiana clássica, designadamente os resultados dos tratamentos se fazerem sentir de forma quase imediata, permitir a inativação de biofilmes e a destruição de fatores de virulência, nomeadamente proteínas ou enzimas secretadas uma vez que as proteínas em solução são altamente vulneráveis à oxidação de aminoácidos sensíveis como a cisteína, metionina, tirosina, triptofano e histidina (Dai et al., 2009).

Uma particularidade interessante da aPDT é a possibilidade de aplicação local do fotossensibilizador e a subsequente reação localizada, não prejudicando assim o tecido circundante nem a sua microflora normal (Maisch et al., 2004). Diz-se então que a aPDT tem uma seletividade dupla, isto é, o PS pode ser orientado para a célula microbiana e a luz pode ser orientada para a área de tecido infetado (Dai et al., 2009).

No entanto, a aPDT apresenta também algumas desvantagens. Como a aplicação da luz visível no tecido vivo é quase por definição um processo localizado, a aPDT só pode ser aplicada no tratamento de doenças localizadas, sendo incompatível com infeções sistémicas como a bacteremia e septicemia (Dai et al., 2009; Kharkwal et al., 2011). Outro fator limitante da aplicação mais ampla da aPDT no tratamento de infeções é a falta de PS antimicrobianos eficazes e com aprovação para uso clínico. Alguns dos PS que têm sido utilizados podem ser eficientes em alguns tipos de microrganismos dependendo da localização da infeção. Sabe-se, no entanto, que estão disponíveis moléculas muito mais eficientes, mas que nunca foram sujeitas aos dispendiosos estudos toxicológicos e de segurança necessários para a aprovação para uso humano (Dai et al., 2009; Kharkwal et al., 2011). Um outro aspeto crítico nas aplicações clínicas da aPDT é a

possibilidade de recrescimento de alguns microrganismos sobreviventes, após o tratamento (Dai et al., 2009).

1.3.3. Aplicações ambientais do efeito fotodinâmico

Os resultados promissores da aPDT no tratamento de doenças causadas por microrganismos levaram ao alargamento da investigação para as aplicações ambientais (Carvalho et al., 2009). Nesta área, a aPDT tem-se mostrado uma abordagem pouco dispendiosa, pouco agressiva para o ambiente e com um nível de segurança elevado para os vários ecossistemas, para os seres humanos, animais e plantas (Almeida et al., 2009). De entre as possíveis aplicações ambientais (Tabela 1.3), tem-se obtido resultados interessantes na desinfecção de águas residuais recolhidas em estações de tratamento e em águas de pisciculturas (Almeida et al., 2011).

Tabela 1.3: Aplicações ambientais da aPDT.

Referência	Aplicação
Alouini e Jemli, 2001	Destruição de ovos de helmintas nas águas residuais.
Jemli et al., 2002	Desinfecção de águas residuais para reutilização para a agricultura.
Bonnett et al., 2006	Desinfecção da água e do fotorreator dos sistemas de circulação de água usando fotossensibilizadores imobilizados em quitosana.
Carvalho et al., 2007	Destruição de bactérias fecais em águas residuais.
Alves et al., 2008	Desinfecção de águas residuais em condições de irradiação naturais (luz solar).
Costa et al., 2008	Inativação fotodinâmica de vírus em águas residuais em condições de irradiação naturais.
Almeida et al., 2009	Terapia fágica e terapia fotodinâmica: abordagens com baixo impacto ambiental para inativar microrganismos em viveiros de piscicultura.
Cassidy et al., 2009	Desinfecção da água potável nos países em desenvolvimento para obtenção de maior qualidade.

A implementação desta tecnologia no ambiente acarreta alguns aspetos a ter em consideração, que enquanto não forem possíveis de satisfazer podem limitar a sua aplicação nesta área. Fazem parte destes aspetos a possibilidade de remover o PS após a ação fotodinâmica para evitar a sua libertação para a saída de água, a estabilização do PS sob as condições de irradiação naturais, a minimização do impacto para as comunidades microbianas não-patogénicas e para os organismos aquáticos e a adequação do procedimento à utilização do sol como fonte de luz (Almeida et al., 2011).

1.4. Fotossensibilizadores

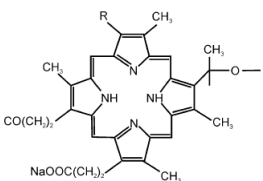
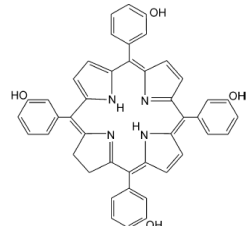
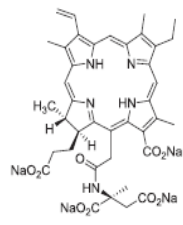
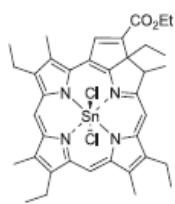
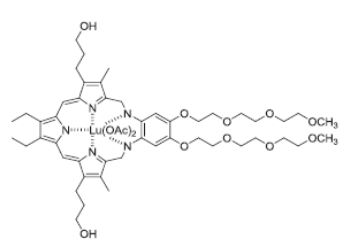
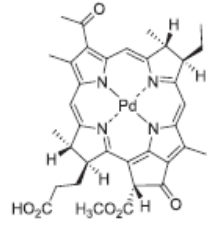
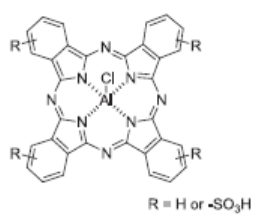
O fotossensibilizador é considerado um dos elementos críticos no processo de PDT (Huang, 2006), uma vez que é este o componente que tem a capacidade de absorver a energia do fóton e utiliza-a para induzir alterações energéticas noutras moléculas não-absorventes (Sibata et al., 2000).

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido dirigidos ao desenvolvimento de fotossensibilizadores de primeira geração e de segunda geração (Yano et al., 2011). O Photofrin[®], amplamente usado no tratamento de situações cancerígenas e pré-cancerígenas de vários tipos de cancro é um exemplo dos fotossensibilizadores de primeira geração. Contudo, estes fotossensibilizadores apresentam algumas desvantagens, das quais se destacam a fotossensibilidade cutânea prolongada, a baixa seletividade pelo tecido tumoral, e a fraca absorção na região do vermelho, a gama de energia que melhor penetra nos tecidos. Além destas limitações, para a maioria dos fotossensibilizadores de primeira geração não estava devidamente isolada nem caracterizada a principal substância ativa, tratando-se pois de misturas de composição variável (Calvete et al., 2009).

Os fotossensibilizadores de segunda geração surgem na tentativa de colmatar algumas das desvantagens apresentadas pelos fotossensibilizadores de primeira geração, procurando ser compostos mais seletivos e ativos (Calvete et al., 2009). Estes PS, incluem derivados de porfirinas reduzidas (clorinas e bacterioclorinas), benzoporfirinas, ftalocianinas e naftalocianinas (Calvete et al., 2009). Estas substâncias apresentam propriedades fotofísicas mais interessantes. Por exemplo, as clorinas e bacterioclorinas apresentam uma banda de absorção intensa entre 660-690 nm e 730 nm, respetivamente. Por sua vez as ftalocianinas e as naftalocianinas apresentam uma banda de absorção intensa entre 670 nm e 820 nm e as benzoporfirinas possuem grande apetência pelas células neoplásicas (Calvete et al., 2009; Yano et al., 2011).

A Tabela 1.4 apresenta alguns dos PS utilizados (aprovados ou em fase de avaliação clínica) para a PDT de vários tipos de cancro (Allison et al., 2004a; Yano et al., 2011). Estas substâncias mostram diferenças nos intervalos entre a administração do PS e a irradiação do tecido neoplásico, na dose de PS administrada e na luz necessária para causar necrose (Calvete et al., 2009).

Tabela 1.4: Fotossensibilizadores aprovados ou em fase clínica para PDT de doenças oncológicas.

Fotossensibilizador (Geração, Tipo)	Tipo de Cancro	Estrutura
Photofrin® (1ª geração, Porfirina)	Esófago; Pulmão; Bexiga; Cervical.	
Foscan® (2ª geração, Clorina)	Esófago; Pulmão; Gástrico; Próstata; Pele; Cabeça e pescoço.	
Laserphyrin® (2ª geração, Clorina)	Pulmão em estágio inicial; Fígado; Cabeça e pescoço.	
Purlytin® (2ª geração, Clorina)	Adenocarcinoma metastático da mama; Carcinoma basocelular (CBC); Sarcoma de Kaposi (pacientes com SIDA).	
Lutrin® (2ª geração, Texafirina)	Próstata; Cervical; Mama; Melanoma; Sarcoma de Kaposi.	
Tookad® (2ª geração, Bacterioclorinas)	Próstata.	
Photosens® (2ª geração, Ftalocianina)	Pele; Mama; Orofaringe; Pulmão; Laringe.	

A escolha e o “design” destes fotossensibilizadores orientou-se pelo que devem ser as características ideais de um PS para PDT. Um PS deve ser uma substância quimicamente pura e de composição constante, apresentar solubilidade em água e/ou nos fluidos corporais (o que condiciona tanto o seu transporte como o tempo de retenção), deve possuir elevado rendimento de oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$) ou outras espécies reativas de oxigénio, elevada seletividade para o tecido neoplásico em relação ao tecido normal, deve ser fotoestável e rapidamente excretado, não deve apresentar toxicidade na ausência de luz nem ser mutagénico, deve absorver energia na zona do vermelho do espectro de visível ($\lambda > 650 \text{ nm}$), uma vez que a radiação destes comprimentos de onda têm maior poder de penetração nos tecidos, tal como deve ser de síntese curta e de elevado rendimento, ter uma relação custo-eficácia e disponibilidade comercial, e fundamentalmente, deve ter a capacidade de provocar necrose dos tecidos neoplásicos (Detty et al., 2004; Calvete et al., 2009; Reddy et al., 2009; Yano et al., 2011).

Os PS de terceira geração surgem na tentativa de maior aproximação aos requisitos do fotossensibilizador ideal, nomeadamente no que diz respeito ao melhoramento da especificidade, solubilidade e toxicidade (Josefsen e Boyle, 2008; Yano et al., 2011).

Uma abordagem promissora é a conjugação do fotossensibilizador com elementos biologicamente ativos, tais como péptidos, anticorpos monoclonais antitumorais, ácido fólico ou açúcares (Yano et al., 2011). A imunoglobulina G (IgG) conjugada com a clorina-e6 e o péptido *HIV-1 Tat* conjugado com a porfirina (Figura 1.7) são modelos de PS de terceira geração que estão ainda em fase preliminar de estudo (Yano et al., 2011).

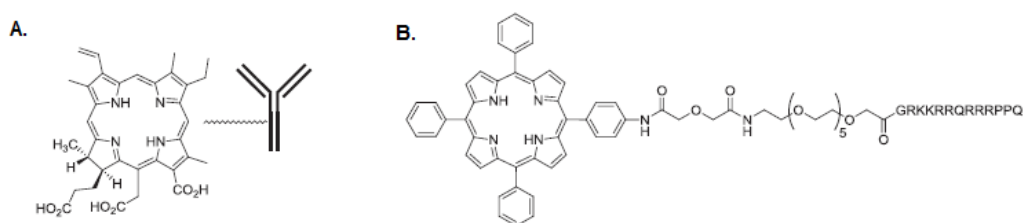


Figura 1.7: Estrutura de dois PS de terceira geração. **A** – IgG conjugada com a clorina. **B** – Porfirina conjugada com o péptido *HIV-1 Tat* (Yano et al., 2011).

Para além das propriedades já descritas, os PS para aplicação em aPDT devem apresentar elevada afinidade e especificidade para as células microbianas, um largo espectro de ação para atuar eficazmente sobre as infeções que envolvem uma flora heterogénea de patogénicos, mecanismo de inativação de células que minimize a

possibilidade de indução da seleção de estirpes resistentes ou a promoção do desenvolvimento de processos mutagênicos e devem ainda possibilitar identificação de uma janela terapêutica que permita a extensa morte das células indutoras de doenças microbianas com danos mínimos para o tecido hospedeiro na área de infecção, e que possibilite a prevenção do recrescimento dos agentes patogênicos após o tratamento (Jori et al., 2006).

Algumas das classes de fotossensibilizadores usadas eficazmente na inativação de um amplo espectro de microrganismos estão apresentadas na Tabela 1.5 (Sharma et al., 2011) e englobam os fotossensibilizadores naturais como psoralenos (furanocumarinas). Outro grupo é constituído por compostos sintéticos não-porfirínicos, como os corantes fenotiazínicos. Da classe de compostos dos macrociclos tetrapirrólicos fazem parte as ftalocianinas e as porfirinas (Wainwright, 1998; Maisch, 2007; Ragàs et al., 2010; Kharkwal et al., 2011).

Tabela 1.5: Classes de fotossensibilizadores usados em aPDT.

Classe de compostos	Nome
Produtos naturais	Furanocumarinas.
Corantes fenotiazínicos	Azul-de-metileno; azul-de-toluidina; acridina.
Macrociclos tetrapirrólicos	Ftalocianinas; porfirinas; clorinas.

Têm sido feitos esforços no sentido de otimizar muitos outros compostos quanto à afinidade para as células microbianas relativamente as células hospedeiras de mamíferos (Harris et al., 2005), à absorção no vermelho-distante e no infravermelho-próximo (Huang et al., 2010) e à fotoestabilidade (Kuznetsova et al., 2009).

O desenvolvimento de novos PS tem também em consideração que, em contraste com a PDT antitumoral, onde o PS é normalmente injetado na corrente sanguínea e se acumula no tumor, no tratamento de infecções localizadas a administração do PS é localizada na área afetada, por aplicação tópica, instilação, injeção intersticial ou administração de aerossol nas vias aéreas (Dai et al., 2009; Kharkwal et al., 2011).

1.4.1. Porfirinas

O nome *porfirina* tem origem na palavra grega *porphura* que significa púrpura (Milgrom, 1997). As porfirinas são uma classe de compostos heterocíclicos aromáticos ubíquos na natureza e envolvidos em processos bioquímicos vitais, como o transporte de oxigênio (heme encontrado na hemoglobina e mioglobina - Figura 1.8A) e a fotossíntese (clorofilas – Figura 1.8B) (Dolphin, 1979).

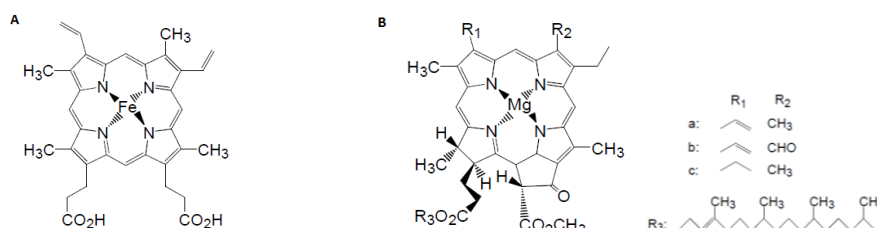


Figura 1.8: Estrutura (A) do grupo heme, e (B) da clorofila (adaptado de White, 2004).

As descobertas dos últimos anos em relação às propriedades físico-químicas das porfirinas fazem com que estas sejam usadas numa variedade de aplicações que passam pelos sistemas de fotossíntese artificial, catálise, catálise enzimática, fotocatálise, sensores, ótica não-linear, PDT de tumores, fotoinativação de microrganismos (aPDT), e mais recentemente, como agentes anti-inflamatórios (Purrello et al., 1999; Chou et al., 2000; Philippova et al., 2003; Stich et al., 2010; Jelic et al., 2012).

As porfirinas, tal como as outras estruturas tetrapirrólicas, exibem um espectro de absorção na região ultravioleta-visível (UV-vis) muito típico (Figura 1.9), com o maior pico entre os 390 e os 425 nm (banda Soret). Além desta banda intensa, existem várias bandas Q de absorvência mais fraca, tendo a última um pico de absorção em torno dos 635 nm (Babilas et al., 2010). As porfirinas são, em geral, intensamente fluorescentes com bandas de emissão na região entre 600-750 nm (White, 2004).

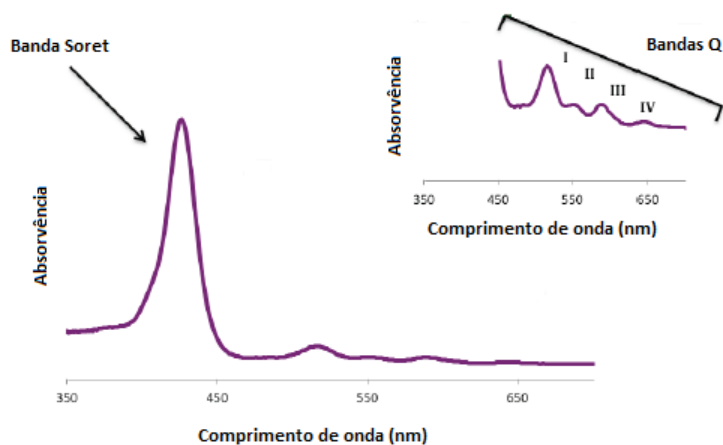


Figura 1.9: Espectro de absorção típico das porfirinas (adaptado de Gomes, 2010).

1.4.2. Porfirinas expandidas

As porfirinas expandidas são análogos sintéticos das porfirinas (Sessler e Seidel, 2003). O nome decorre, normalmente, do maior número de anéis de pirrol, em comparação com as porfirinas que contêm apenas quatro anéis de pirrol ligados por pontes *meso*-metínicas (Figura 1.10) (Shin et al., 2010). Por definição, as porfirinas expandidas diferem das porfirinas e de outros macrociclos tetrapirrólicos naturais por conterem um núcleo central maior, com um mínimo de 17 átomos. O resultado desta expansão do núcleo produz sistemas com novas características espectrais e eletrônicas (Sessler e Seidel, 2003).

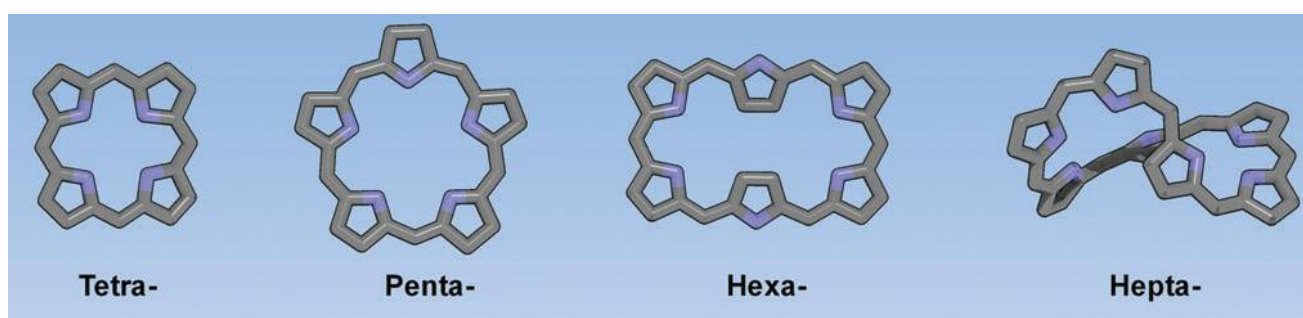


Figura 1.10: Estrutura de vários porfirinóides (adaptado de Shin et al., 2010).

A primeira porfirina expandida foi descoberta no decorrer da síntese da vitamina B12 em 1966, tendo sido designada como safirina (Pushpan e Chandrashekar, 2002). Esta molécula contém cinco anéis de pirrol ligados através de quatro pontes metínicas (Srinivasan e Furuta, 2005). Desde então, uma série de porfirinas expandidas têm sido descritas mas, apesar de todas as descobertas, os avanços significativos nos processos de síntese das porfirinas expandidas de modo a obter quantidades razoáveis são bastante recentes (Chandrashekar e Venkatraman, 2003).

Ao contrário das porfirinas, as porfirinas expandidas são sistemas que contêm mais do que 18 elétrons π . O número de elétrons π pode ser aumentado quer aumentando as ligações duplas do conjugado entre os quatro anéis de pirrol, quer por aumento do número em cinco ou mais anéis de pirrol (Sessler et al., 1999). Tendo isto em conta, são relatadas na literatura porfirinas expandidas contendo até 64 elétrons π (Misra e Chandrashekar et al., 2008).

Uma das características mais distintas das porfirinas expandidas é o seu espectro de absorção significativamente deslocado para o vermelho, e a maior parte das vantagens da aplicação decorrem deste aspeto. Geralmente, quanto maior o macrociclo expandido,

maior será o deslocamento batocrômico no espectro de absorção, porque a deslocalização de elétrons π expande-se à medida que o macrociclo se torna maior. No entanto, as porfirinas expandidas com mais de seis anéis de pirrol sofrem uma distorção estrutural, que em muitos casos, se torna difícil de compatibilizar com uma estrutura planar típica dos compostos aromáticos (Figura 1.10). Como resultado, a deslocalização de elétrons π ao longo da estrutura molecular é dificultada. Assim, enquanto que as bandas de absorção de uma série de porfirinas expandidas planares representativas mostra um deslocamento contínuo para a região do vermelho, algumas das porfirinas expandidas maiores com topologias distorcidas exibem espectros de absorção amplos e mal definidos. Considerando que a estrutura molecular global é um fator importante para determinar as estruturas eletrônicas das porfirinas expandidas pela extensão da conjugação π , o controle da topologia molecular é bastante relevante para a compreensão da relação entre a estrutura e as propriedades moleculares das porfirinas expandidas (Shin et al., 2010).

As porfirinas expandidas mostram grande diversidade estrutural e apresentam flexibilidade conformacional, sendo esta dependente da natureza da ligação dos anéis heterocíclicos, da natureza e do número de heteroátomos, e do estado de protonação. É possível modificar a conformação através da variação da temperatura ou por modificação química simples como a protonação por ácidos (Misra e Chandrashekar et al., 2008). Descobriu-se recentemente, que algumas porfirinas expandidas existem em diferentes estados de oxidação (Comuzzi et al., 2006).

A estrutura eletrônica e a reatividade dos macrociclos expandidos podem ser controladas alterando o núcleo das porfirinas, envolvendo substituições de um heteroátomo ou mais, tais como O, S, Se ou Te pelo NH pirrólico, levando à formação de "porfirinas expandidas de núcleo modificado". Estas retêm a estrutura básica do macrociclo da porfina, mas sofrem alterações das propriedades eletrônicas e fotoquímicas (Chandrashekar e Venkatraman, 2003).

Do ponto de vista estrutural, as porfirinas expandidas com substituintes *meso* arilo mostram uma diversidade estrutural elevada, onde um ou mais anéis heterocíclicos exibem um ângulo de 180° levando a estruturas parcialmente invertidas. Nesta categoria incluem-se macrociclos confusos (Narayanan et al., 2000; Pushpan et al., 2001). As porfirinas expandidas na forma livre têm afinidade para metais de transição enquanto na sua forma protonada ligam-se aos aniões (Sessler e Davis, 2001).

O interesse das porfirinas expandidas cresceu recentemente devido à versatilidade evidenciada por estas moléculas e ao seu uso potencial numa variedade de aplicações

(Krivokapic et al., 2003; Comuzzi et al., 2006). As porfirinas expandidas são importantes na coordenação de metais, no estabelecimento de ligações aniônicas, transporte de aniões, como materiais óticos não lineares e em aplicações biomédicas como PS na terapia fotodinâmica (PDT), agentes de contraste em ressonância magnética (RM), e como amplificadores de radiação em radioterapia (Chandrashekar e Venkatraman, 2003; Srinivasan e Furuta, 2005; Comuzzi et al., 2006; Higashino et al., 2010).

1.4.2.1. Hexafirinas

Há atualmente um grande interesse na obtenção de novas moléculas que possam ser utilizadas como PS em PDT e aPDT ou que se revelem interessantes para outras aplicações biomédicas. As porfirinas e os seus análogos têm sido extensivamente estudadas. Contudo, a maioria das porfirinas apresenta baixa absorção na janela fototerapêutica (cerca de 600-1000 nm), como já foi referido, onde a luz pode ser utilizada de forma mais eficaz, uma vez que penetra mais profundamente nos tecidos (Bonnett, 1995).

As porfirinas expandidas são encaradas com interesse quanto à sua melhor absorção na região do vermelho. No entanto, as primeiras hexafirinas sintetizadas apresentavam fraca estabilidade, o que dificultava a sua caracterização espectroscópica (Neves et al., 1999). Estes sistemas hexapirrólicos podem ser considerados como homólogos reais das porfirinas, sendo um sistema cíclico de conjugações π com arranjo alternativo de anéis heterocíclicos e pontes metínicas. A presença de seis pontes metínicas nas posições *meso* torna estas moléculas flexíveis, e, portanto, as hexafirinas adotam geralmente diferentes conformações: normal, invertida ou *em forma de oito* (Misra e Chandrashekar et al., 2008).

Um grande número de hexafirinas mais estáveis tem sido sintetizado, por alteração dos substituintes nas posições *meso*- e/ou β -pirrólicas, por ligações entre as pontes metínicas e os pirróis, ou através da substituição do azoto do pirrol por outros átomos pesados (Shin et al., 2010). A Figura 1.11 mostra um exemplo de uma hexafirina sintética estável, a partir da qual outras foram sintetizadas, assim como o espectro de absorção e de emissão (fluorescência) que apresenta. O espectro de visível revela um pico forte a 567 nm, a banda Soret, e várias bandas Q na região do infravermelho próximo (NIR). Por sua vez, a emissão de fluorescência verifica-se acima dos 1000 nm (Shin et al., 2010).

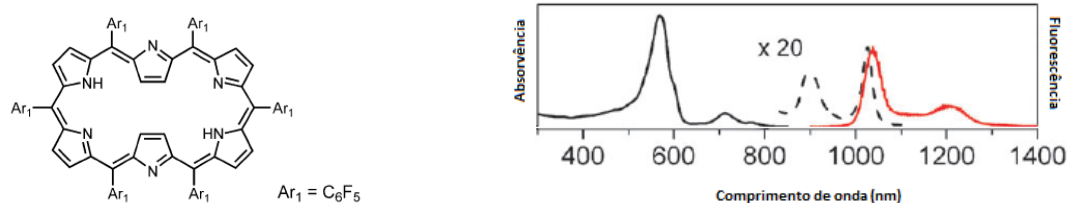


Figura 1.11: Estrutura da [26]hexafirina (à esquerda) e respetivo espetro de absorção (linha preta) e de fluorescência (linha vermelha) (à direita) (adaptado de Shin et al., 2010).

As características espectroscópicas, nomeadamente a capacidade de absorver radiação a elevados comprimentos de onda, faz com que estas moléculas possam vir a ser bastante promissoras para PDT antitumoral, assim como para o tratamento de infeções microbianas (aPDT), uma vez que ao serem utilizadas como PS poderá ser utilizada luz de comprimento de onda com superior penetração nos tecidos (Figura 1.12), e assim apresentar maior efeito terapêutico (Anstey, 2004). No entanto, não existem estudos que avaliem o efeito antimicrobiano das porfirinas expandidas, assim como estudos que analisem especificamente a eficiência das hexafirinas como fotossensibilizadores.

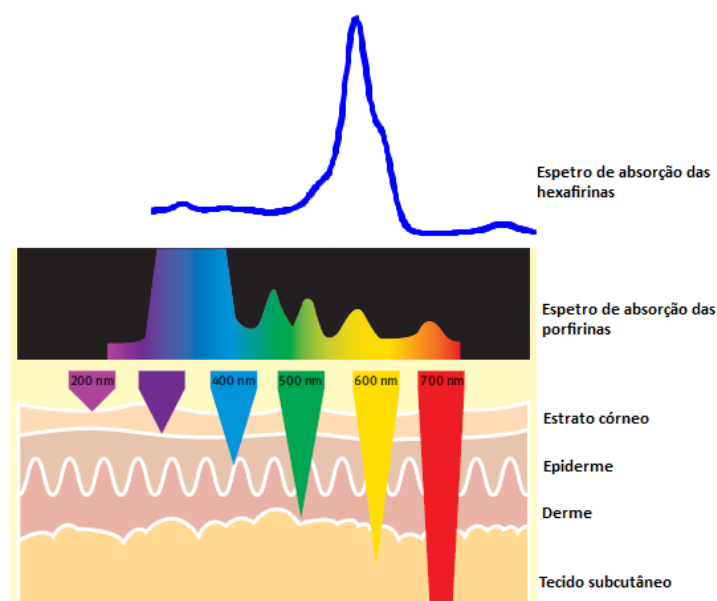


Figura 1.12: Representação esquemática da penetração da luz na pele, a qual aumenta a comprimentos de onda maiores sendo, portanto, a luz vermelha utilizada preferencialmente para PDT (adaptada de Anstey, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de uma série de hexafirinas poderem atuar como fotossensibilizadores em células bacterianas. Deste modo foi realizada a caracterização de algumas das suas propriedades fotofísicas e químicas e foi avaliado o seu potencial na inativação fotodinâmica de microrganismos usando testes rápidos e metodologias dependentes de cultivo.

Material e métodos

2. Material e métodos

2.1. Fotossensibilizadores

Para os ensaios de aPDT foram usados dois fotossensibilizadores amplamente estudados (Almeida et al., 2011), considerados como fotossensibilizadores de referência, e três hexafirinas sintéticas, testadas como potenciais novos fotossensibilizadores. Os PS de referência usados foram: tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina e tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil]porfirina, designadas por PS 1 e PS 2, respetivamente (Figura 2.1). As hexafirinas testadas foram sintetizadas pelo Grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (Figura 2.2). O derivado Hexa-SPy⁺-Me, é um composto catiónico (PS 3) que corresponde à mistura das formas catiónicas oxidada e reduzida de: hexaiodeto de 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil][26]hexafirina e hexaiodeto 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil][28]hexafirina (Figura 2.2). As correspondentes formas neutras, 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(4-piridilsulfanil)fenil][26]hexafirina e a 5,10,15,20,25,30-hexaquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(4-piridilsulfanil)fenil][28]hexafirina, foram também avaliadas tendo sido designados por PS 4 e PS 5, respetivamente (Figura 2.2).

As soluções de trabalho foram preparadas a 500 µM de cada PS em dimetilsulfóxido (DMSO), esterilizadas por filtração e guardadas em frascos escuros à temperatura ambiente. Antes de cada ensaio, estas soluções de trabalho foram sonificadas durante 15 minutos num banho SilverCrest (Ultrasonic Cleaner 220-240 V 50 Hz, 50 W) para homogeneizar e destruir agregados que eventualmente se tenham formado durante a conservação.

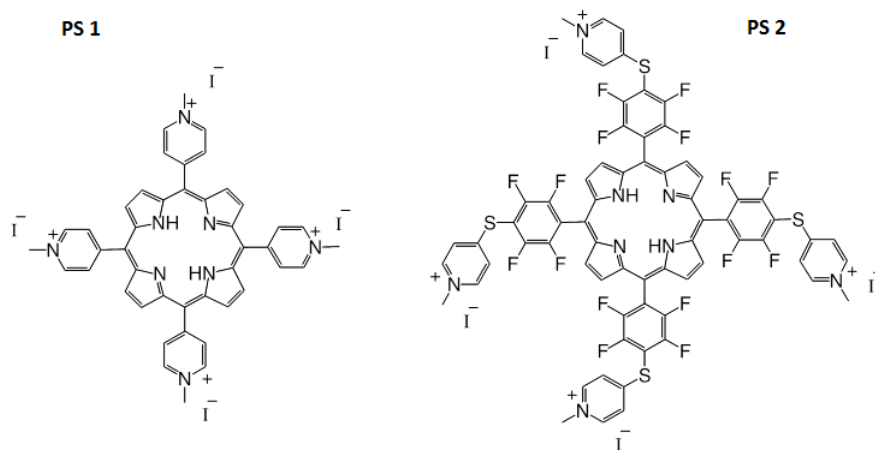


Figura 2.1: Representação da estrutura dos fotossensibilizadores de referência (PS 1 e 2) usados nos ensaios de aPDT.

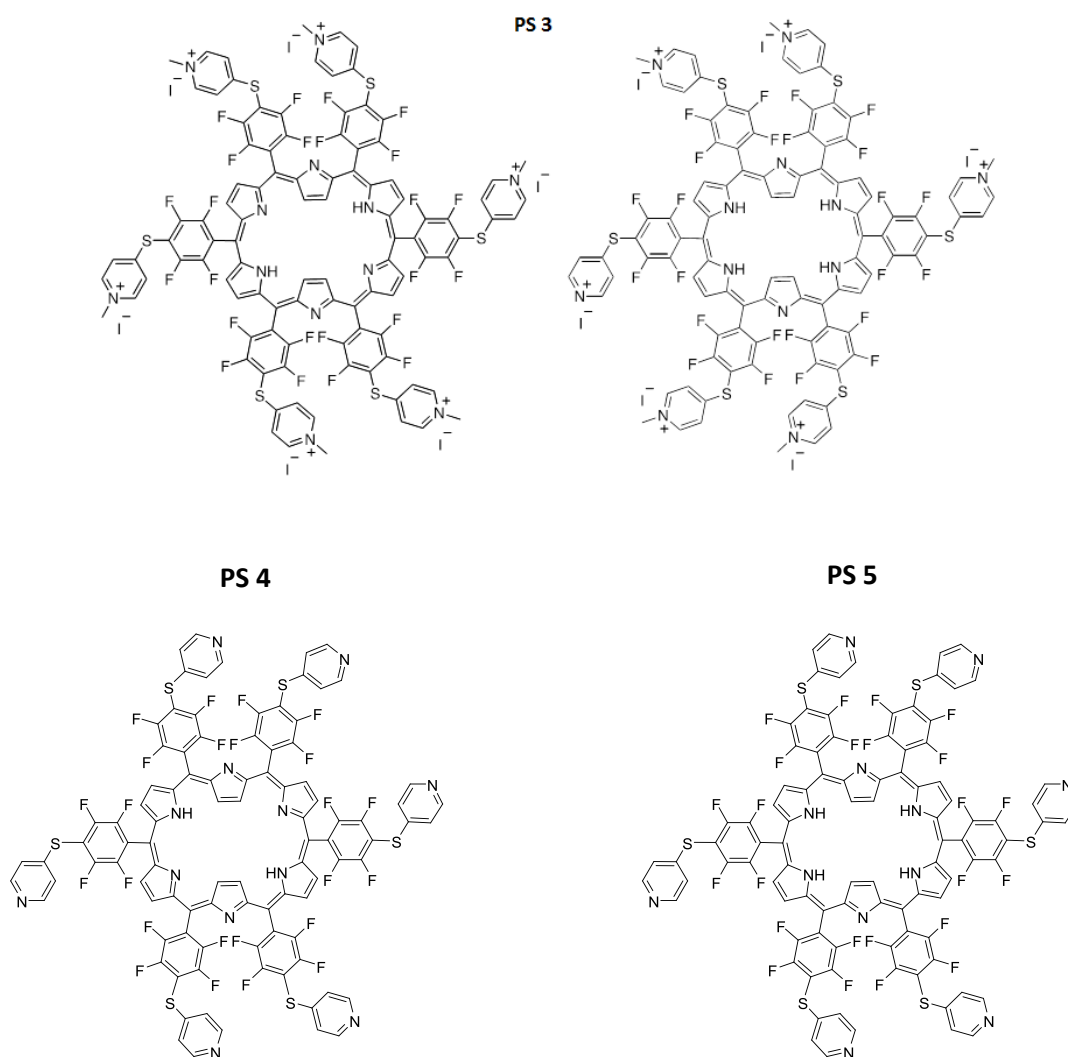


Figura 2.2: Representação da estrutura das hexafirinas catiónicas (PS 3) e neutras (PS 4 e 5) testadas como fotossensibilizadores nos ensaios de aPDT.

2.2. Estirpes bacterianas e condições de crescimento

Os ensaios de inativação foram realizados segundo dois formatos. Para o *screening* rápido do efeito fotodinâmico das hexafirinas usou-se um ensaio de bioluminescência baseado na medição de luz emitida por uma estirpe recombinante de *Escherichia coli*, transformada com os genes *luxCDABE* da bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* (Alves et al., 2008). Para os ensaios de inativação, o efeito dos fotossensibilizadores de referência e das hexafirinas foi avaliado em *Staphylococcus* sp. (Gram-positiva) e em *Escherichia coli* ATCC 13706 (Gram-negativa) por determinação do teor de células viáveis ao longo da experiência, procedendo-se à contagem de colônias após sementeira em meio sólido.

2.2.1. *Escherichia coli* bioluminescente

Uma cultura de *Escherichia coli* bioluminescente armazenada a -80 °C em 10% de glicerol foi revivificada em Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) contendo 100 mg·mL⁻¹ de ampicilina e 25 mg·mL⁻¹ de cloranfenicol. A placa foi incubada por um dia, a 26 °C, e posteriormente mantida a 4 °C (Alves et al., 2008). A partir de uma colônia isolada foi preparada uma cultura-mãe líquida em 30 mL de Luria Broth (LB, 5 g de triptona, 2.5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl para um volume final de 500 mL de H₂O) adicionado dos antibióticos como referido anteriormente. A cultura foi incubada aproximadamente 12 h, a 26 °C, com agitação (150 rpm) e conservada a 4 °C. Antes de cada ensaio de inativação, uma alíquota da cultura-mãe (240 µL) foi assepticamente transferida para 20 mL de meio LB com antibióticos frescos, e incubada aproximadamente 12 h, a 26 °C, com agitação (150 rpm).

2.2.2. *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* ATCC 13706

Os ensaios em que a inativação foi avaliada pela variação do teor de células viáveis foram realizados com uma estirpe ambiental de *Staphylococcus* sp. e uma estirpe de coleção de *Escherichia coli* (ATCC 13706). A estirpe ambiental de *Staphylococcus* foi isolada a partir da água da microcamada superficial do sistema estuarino da Ria de Aveiro (Santos et al., 2011). De uma cultura de *Staphylococcus* sp. em TSA (Merck) conservada

a 4 °C, repicou-se assepticamente uma colônia isolada para 30 mL de Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) e incubou-se a 37 °C durante 24 horas com agitação (100 rpm). Durante o período de realização dos ensaios, esta cultura (cultura-mãe) foi conservada a 4 °C. Para obtenção da cultura-mãe de *Escherichia coli* ATCC 13706 repicou-se assepticamente uma colônia isolada de uma cultura em TSA, conservada a 4 °C para 30 mL de TSB. A cultura foi incubada durante 16 horas, a 37 °C, com agitação (100 rpm) sendo posteriormente conservada a 4 °C.

Antes de cada experiência de inativação fotodinâmica, uma alíquota (300 µL) de cada cultura-mãe foi transferida em condições de assepsia para 30 mL de meio TSB fresco e incubada a 37 °C até uma densidade ótica de $\approx 0,8$ a 600 nm (aproximadamente 16 h) para obter a cultura de trabalho. Para determinar a concentração de unidades formadoras de colônias (UFC) na cultura de trabalho, alíquotas de 100 µL foram diluídas em série em tampão fosfato salino (PBS, 4 g NaCl, 0.1 g KCl, 0.12 g KH₂PO₄, 0.72 g Na₂KPO₄, para um volume final de 500 mL de H₂O, com pH de 7.4 ± 0.2) e semeadas por incorporação, em duplicado, em TSA. As culturas foram incubadas a 37 °C e a contagem de colônias na diluição mais conveniente foi efetuada após 48 h de incubação para *Staphylococcus* sp. e 24 h de incubação para *E. coli*.

2.3. Montagem experimental dos ensaios de aPDT

As suspensões bacterianas a irradiar foram preparadas a partir das culturas de trabalho ($\approx 10^9$ UFC.mL⁻¹, D.O. $\approx 0,8$ a 600 nm) de *Staphylococcus* sp., de *E. coli* ATCC 13706 e de *E. coli* bioluminescente, diluindo 1:10 em PBS, para uma concentração final de $\approx 10^8$ UFC.mL⁻¹. Em cada uma das experiências, foram transferidos assepticamente 3 mL de suspensão bacteriana para copos de vidro esterilizados e adicionou-se um volume conveniente da solução de trabalho de PS de modo a obter concentrações finais de 5 µM e 10 µM. A cada copo adicionou-se a quantidade de PBS para perfazer o volume final de 10 mL. Após a adição da solução de porfirina no volume apropriado, todos os copos foram protegidos da luz com folha de alumínio e incubados durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente (25-27 °C), com agitação suave (100 rpm) de modo a permitir a adsorção do PS ao material biológico.

Nas experiências com fotossensibilizadores neutros, foram realizados em paralelo ensaios em que para além do fotossensibilizador e de PBS, se adicionou à mistura 5% ou

10% de DMSO, de forma a minimizar a tendência de agregação dos compostos. Nestes casos, foram incluídos os controlos correspondentes.

2.3.1. Condições de irradiação

Após o período de pré-incubação no escuro, as amostras foram irradiadas com luz branca (400-800 nm) ou luz vermelha (530-800 nm) emitida por um sistema de iluminação (LC-122 LumaCare, London) equipado com uma lâmpada de halogéneo 250 W e um filtro de corte, com uma intensidade 150 mW.cm^{-2} medida com um potenciómetro LI-COR (Modelo LI-250, Li-Cor inc., EUA). A irradiação foi conduzida durante 30 minutos à temperatura ambiente (25-27 °C) mantendo as suspensões com agitação, sobre uma plataforma magnética.

2.3.2. Testes de *screening* com bioluminescência

A estirpe *E. coli* bioluminescente foi utilizada para uma análise preliminar do desempenho das hexafirinas sem carga (neutras). Em cada momento de amostragem (tempo 0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de irradiação) foram recolhidas alíquotas de 500 µL de suspensão e, sempre que necessário, preparou-se uma série de diluições assépticas em PBS de modo a ajustar a emissão de luz à gama de leitura do equipamento. A quantificação da emissão de luz foi feita num luminómetro (TD-20/20 Luminometer, Turner Designs, Inc., USA). A conversão de unidades de emissão de luz em UFC.mL^{-1} , fez-se com a reta de calibração preestabelecida para as condições experimentais usadas (Alves et al., 2008) com uma correspondência de 10^5 URL.mL^{-1} (luminescência bacteriana inicial) para $\approx 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$.

2.3.3. Quantificação de unidades formadoras de colónias

A inativação da estirpe Gram-positiva (*Staphylococcus* sp.) e da estirpe Gram-negativa (*E. coli* ATCC 13706) ao longo do tempo de irradiação foi avaliada por recolha periódica de alíquotas da suspensão de células. O teor bacteriano foi determinado por quantificação de unidades formadoras de colónias (UFC). Em cada momento de

amostragem (tempo 0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de irradiação), foram recolhidas alíquotas de 100 µL de suspensão que se usaram para preparar uma série de diluição em PBS e semear por incorporação, em duplicado, em TSA. A contagem de colónias foi efetuada após incubação no escuro, a 37 °C, durante 48 h para *Staphylococcus* sp. ou 24 h para *E. coli* ATCC 13706. As colónias foram contadas na diluição mais adequada. A concentração de células viáveis foi estimada a partir do valor médio de UFC nas duas réplicas, corrigida com o fator de diluição e expressa em UFC.mL⁻¹. Foram realizados dois ensaios independentes para cada um dos PS de referência (porfirinas) e para cada uma das hexafirinas, sendo os resultados finais expressos como a média dos dois ensaios. Os resultados foram representados como gráficos do teor de sobreviventes [$\log(\text{UFC.mL}^{-1})$] em cada tempo de irradiação (minutos).

2.3.4. Controlos

Em todas as experiências foram incluídos um controlo claro e um controlo escuro. Os controlos claros consistiram nas suspensões bacterianas em PBS, sem adição de PS e seguiram o mesmo protocolo de pré-incubação e irradiação que as amostras. Os controlos escuros foram preparados de forma idêntica às amostras, com a mais alta concentração de PS testada (10 µM) mas foram protegidos da luz com folha de alumínio durante todo o ensaio, incluindo o procedimento de quantificação de UFC ou de leitura de bioluminescência.

2.4. Estudo da fotoestabilidade das hexafirinas

Uma alíquota de 2 mL de cada solução de PS foi irradiada numa cuvete de vidro (absorvência aproximadamente de 1) sob as mesmas condições utilizadas nos ensaios biológicos (luz branca, 400-800 nm, 30 minutos), à temperatura ambiente e sob agitação magnética. As soluções foram preparadas com os solventes seguintes: tampão fosfato salino (PBS), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e diclorometano (CH₂Cl₂).

Com o intuito de monitorizar possíveis mudanças no comportamento espectroscópico, foi registado o espectro de absorção de cada amostra, em períodos de tempo de irradiação diferentes (0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos). Foram realizadas dois ensaios independentes para cada experiência.

2.5. Estudo da produção de oxigênio singlete das porfirinas e hexafirinas

Numa cuvete de vidro, uma alíquota de 2 mL contendo 0.5 μM de PS e 50 μM de 1,3-difenilisobenzofurano (DPiBF) em DMF/H₂O (9:1) foi irradiada com um *array* de díodos com emissão de luz entre os 610 e os 780 nm, com uma intensidade de 9.0 mW.cm⁻². A irradiação foi conduzida à temperatura ambiente, sob agitação magnética suave, durante 30 minutos. O decaimento da absorvência do DPiBF a 415 nm foi medido durante a irradiação (0-30 minutos). A percentagem de decaimento da absorvência, foi interpretada como estimativa da produção de ¹O₂, sendo calculada pela comparação da absorvência inicial da solução e a absorvência após um determinado período de irradiação.

2.6. Avaliação da solubilidade da hexafirina Hexa-SPy⁺-Me (PS 3) nas condições experimentais

A solubilidade da hexafirina Hexa-SPy⁺-Me (PS 3) em PBS foi avaliada por espectroscopia de UV-vis. Foram analisadas concentrações entre 0.5 e 20 μM , preparadas pela adição sucessiva de alíquotas da solução de trabalho (500 μM) da hexafirina. Para verificar a conformidade dos resultados com a lei de Beer-Lambert, representou-se graficamente a intensidade da banda Soret em função da concentração de PS.

Resultados

3. Resultados

3.1. Ensaios de fotoinativação

3.1.1. Ensaios de *screening* com *Escherichia coli* bioluminescente

Os resultados dos ensaios de *screening* realizados para obter uma avaliação preliminar do efeito fotodinâmico das duas hexafirinas neutras (PS 4 e PS 5) em *E. coli* bioluminescente, bem como os ensaios paralelos com adição de 5% e com 10% de DMSO, e com luz vermelha, são apresentados nas Figuras 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4.

O PS 4 (5 e 10 μM) não produziu qualquer efeito sobre a bioluminescência de *E. coli* durante as experiências de irradiação com luz branca, tanto sem DMSO (Figura 3.1a) como com 5% (Figura 3.1b) e com 10% de DMSO (Figura 3.1c).

Os resultados obtidos nas experiências com luz vermelha (Figura 3.2) com o mesmo composto (PS 4) também não apresentam evidência de inativação uma vez que não houve redução da bioluminescência nas experiências nem nos ensaios realizados sem DMSO (Figura 3.2a), nem com 5% (Figura 3.2b) e com 10% de DMSO (Figura 3.2c), na presença do PS 4 (5 e 10 μM).

Os resultados dos ensaios com PS 5, com luz branca e com luz vermelha, são apresentados nas Figuras 3.3 e 3.4, respetivamente. Após irradiação com luz branca por 30 minutos, a uma intensidade de 150 mW.cm^{-2} , o PS 5 nas concentrações usadas (5 e 10 μM), não causou redução significativa da bioluminescência em nenhuma das condições testadas: sem DMSO (Figura 3.3a), com 5% de DMSO (Figura 3.3b), e com 10% de DMSO (Figura 3.3c). Os resultados apresentados na Figura 3.4 indicam que os resultados obtidos com luz vermelha são idênticos aos obtidos com luz branca, não se observando variação significativa da bioluminescência de *E. coli* durante a irradiação, em nenhuma das condições experimentais testadas.

Os resultados correspondentes aos controlos confirmam que a viabilidade bacteriana não foi diretamente afetada pela luz nem por nenhum dos compostos (PS 4 e PS 5) no escuro, nem pelo DMSO.

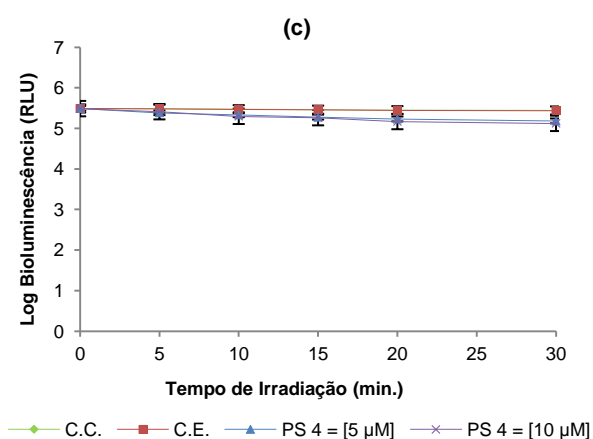
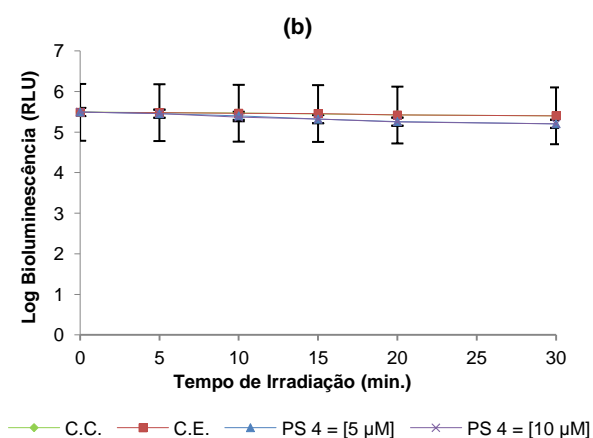
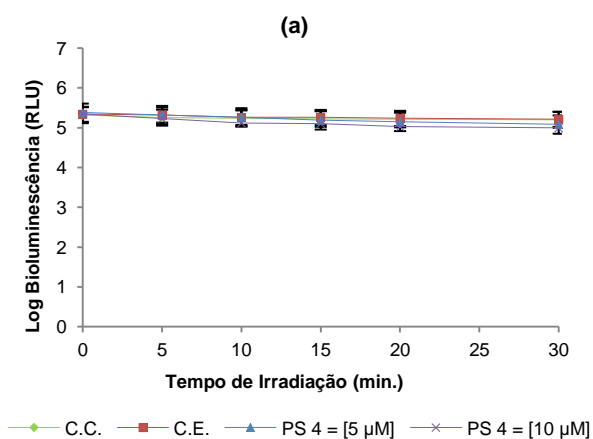


Figura 3.1: Variação da bioluminescência de *E. coli* durante as experiências de aPDT **(a)** sem DMSO, **(b)** com 5% de DMSO, e **(c)** com 10% de DMSO, com o PS 4 (5 μM e 10 μM), usando luz branca (150 mW.cm^{-2}). Os valores correspondem à média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

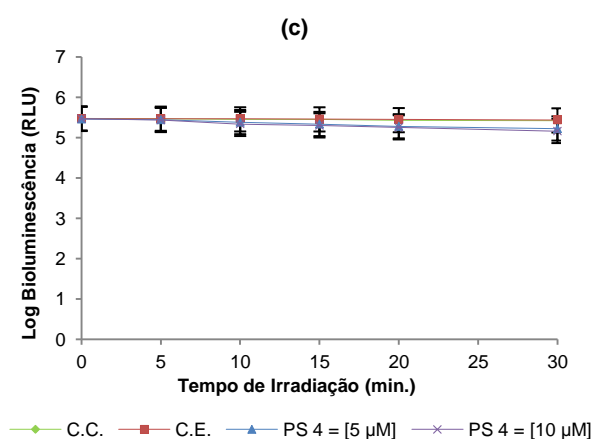
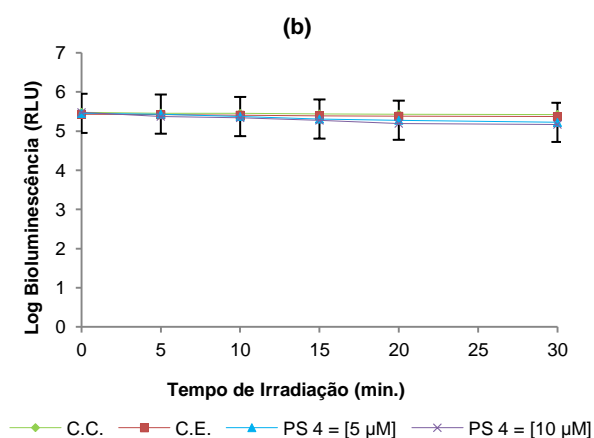
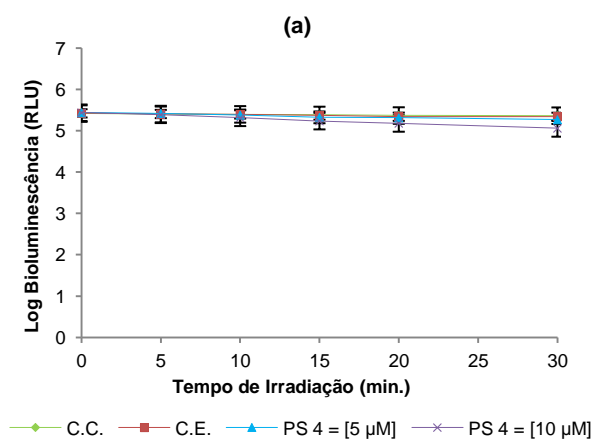


Figura 3.2: Variação da bioluminescência de *E. coli* durante as experiências de aPDT **(a)** sem DMSO, **(b)** com 5% de DMSO, e **(c)** com 10% de DMSO, com o PS 4 (5 μM e 10 μM), usando luz vermelha (150 mW.cm^{-2}). Os valores resultam da média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

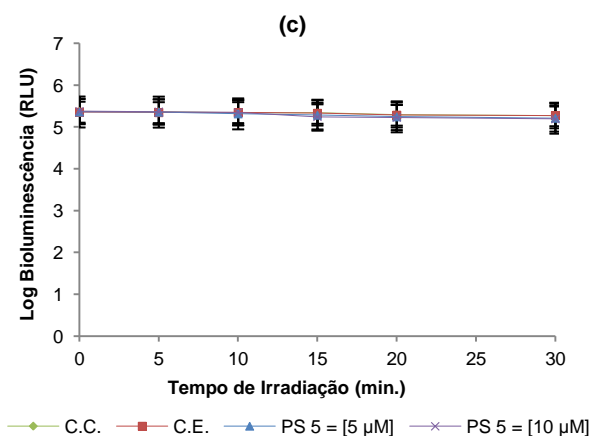
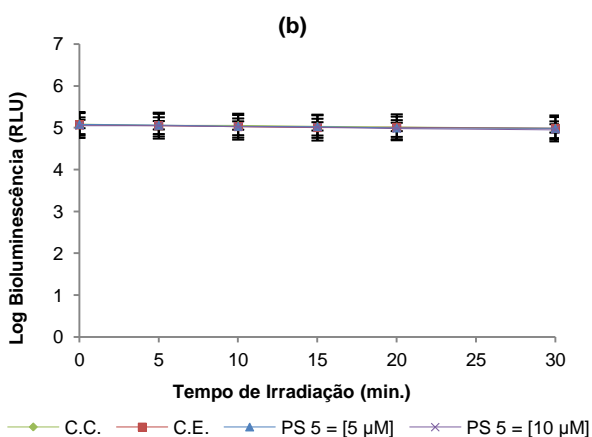
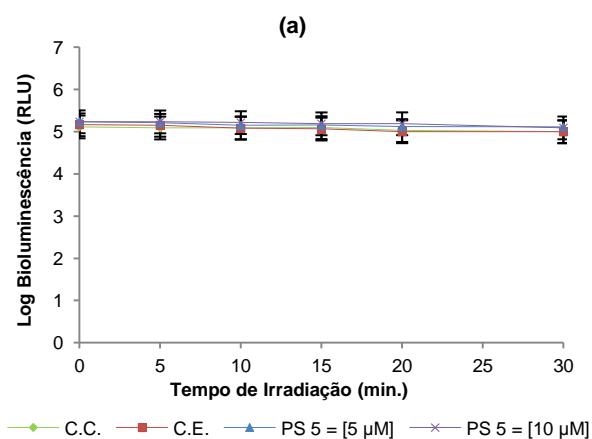


Figura 3.3: Variação da bioluminescência de *E. coli* durante as experiências de aPDT (a) sem DMSO, (b) com 5% de DMSO, e (c) com 10% de DMSO, com o PS 5 (5 μ M e 10 μ M), usando luz branca (150 mW.cm^{-2}). Os valores correspondem à média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

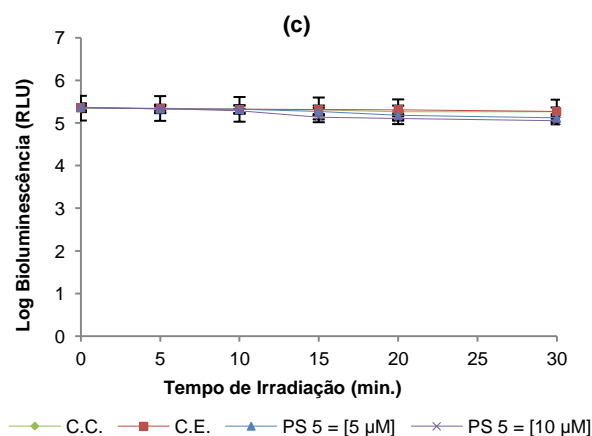
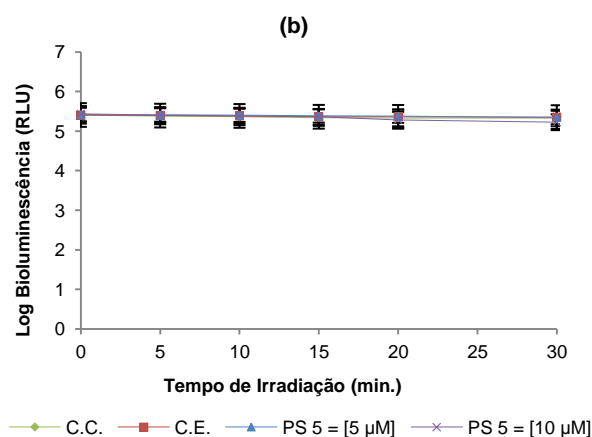
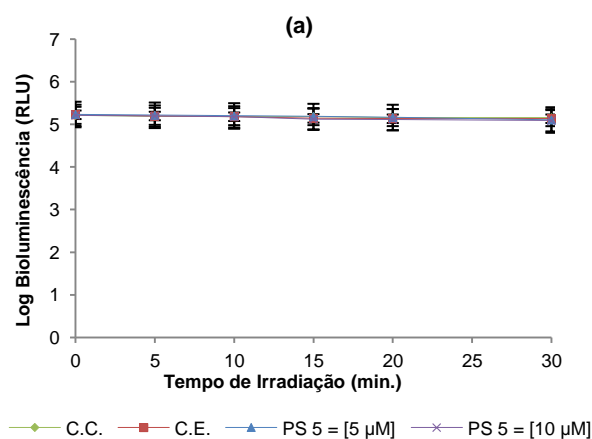


Figura 3.4: Variação da bioluminescência de *E. coli* durante as experiências de aPDT (a) sem DMSO, (b) com 5% de DMSO, e (c) com 10% de DMSO, com o PS 5 (5 μ M e 10 μ M), usando luz vermelha (150 mW.cm^{-2}). Os valores resultam da média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

3.1.2. Experiências de inativação com os fotossensibilizadores de referência

Os resultados de inativação de *Staphylococcus* sp. e *E. coli* ATCC 13706 com as porfirinas (PS 1 e PS 2) tomadas como fotossensibilizadores de referência, obtidos nas experiências de irradiação com luz branca são apresentados nas Figuras 3.5 e 3.6.

Ambos os PS causaram inativação em *Staphylococcus* sp., após 30 minutos de irradiação (Figura 3.5). O PS 1, nas concentrações testadas (1 μ M e 5 μ M) causou reduções de cerca de 7 log e de 8 log, respectivamente. O PS 2, testado nas mesmas concentrações que o PS 1, revelou menor eficiência de inativação causando uma redução de 6 log, na concentração de 1 μ M, e de 7 log, na concentração de 5 μ M, após 30 minutos de irradiação.

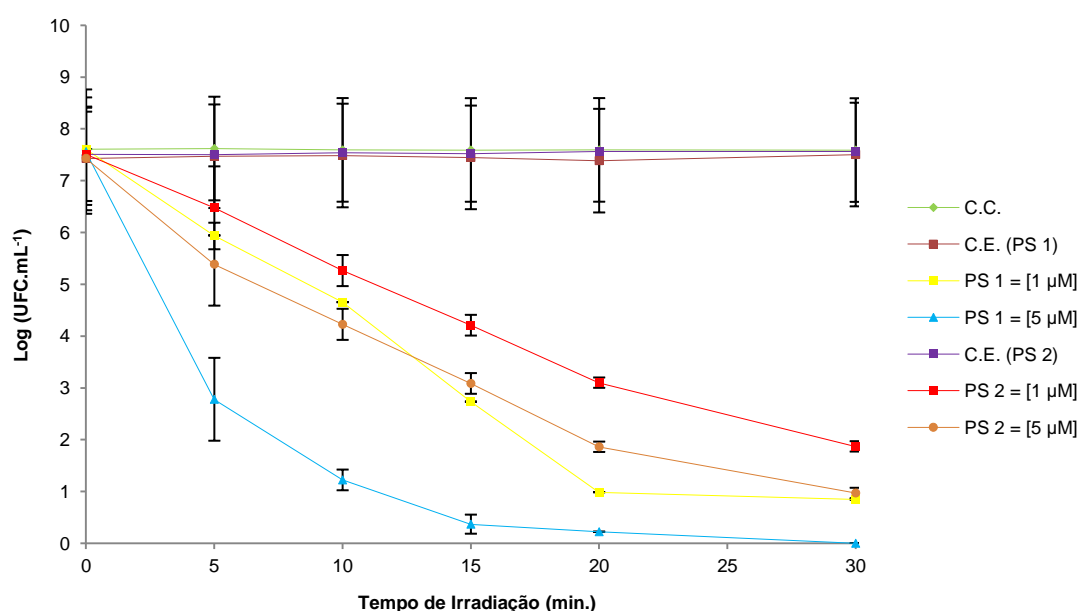


Figura 3.5: Variação da concentração de UFC de *Staphylococcus* sp. durante as experiências de inativação com o PS 1 e com o PS 2, nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M, usando luz branca com uma intensidade de 150 mW.cm⁻². Os valores correspondem à média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

A eficiência de inativação de *E. coli* ATCC 13706 com os compostos de referência PS 1 e PS 2 foi menor do que a observada em *Staphylococcus* sp. com os mesmos compostos (Figura 3.6). Na concentração de 5 μ M, O PS 1 causou uma inativação de aproximadamente 6 log, enquanto que o PS 2, na mesma concentração, causou uma redução de apenas 3 log. Na concentração mais elevada (10 μ M) o PS 1 causou uma redução de 5 log no teor de células viáveis.

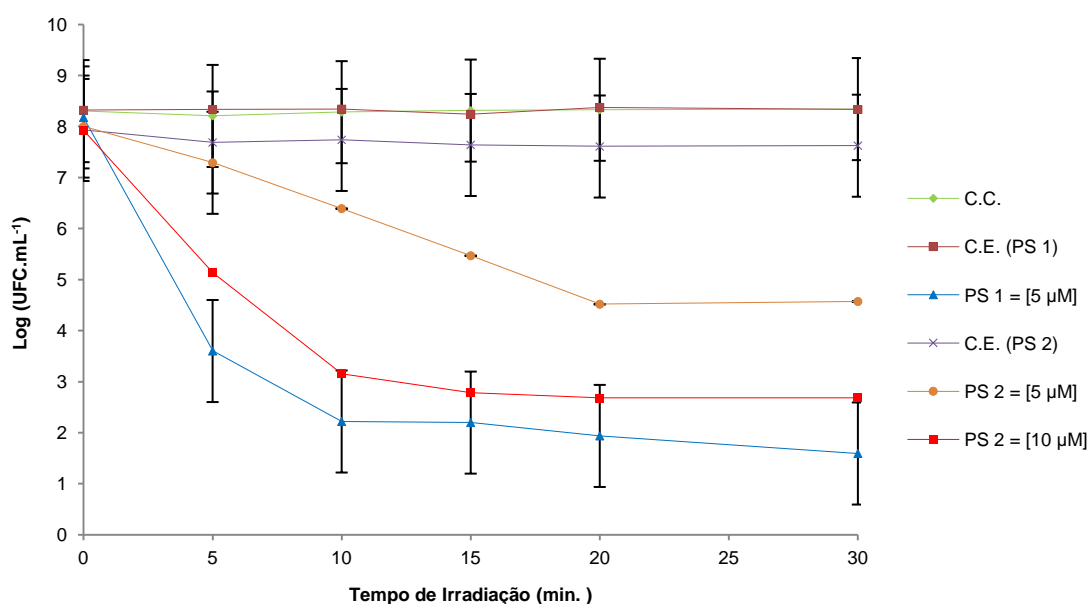


Figura 3.6: Variação da concentração de UFC de *Escherichia coli* ATCC 13706 durante as experiências de inativação com o PS 1 (5 µM) e com o PS 2 (5 µM e 10 µM), usando luz branca (150 mW.cm⁻²). Os valores correspondem à média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados obtidos nos controles claros e nos controles escuros confirmam que a viabilidade bacteriana não foi afetada diretamente pela luz em nenhuma das estirpes, e que nenhuma das porfirinas (PS 1 ou PS 2) é tóxica no escuro, mesmo na concentração mais elevada usada nos ensaios de inativação.

3.1.3. Experiências de inativação com hexafirinas catiónicas

Na Figura 3.7 são apresentados os resultados obtidos em duas experiências independentes de irradiação com luz branca, com o PS 3 nas concentrações de 5 µM e 10 µM, testado sobre as bactérias *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* ATCC 13706. O PS 3 não causou inativação nem da bactéria Gram-positiva (Figura 3.7a) nem da bactéria Gram-negativa (Figura 3.7b), não havendo variações significativas do teor de células viáveis. Os testes contendo PS 3 apresentam, em ambas as concentrações, o mesmo comportamento que os controles, facto que mostra que não há qualquer tipo de toxicidade por parte deste composto, nem com ação da luz nem sem a presença desta.

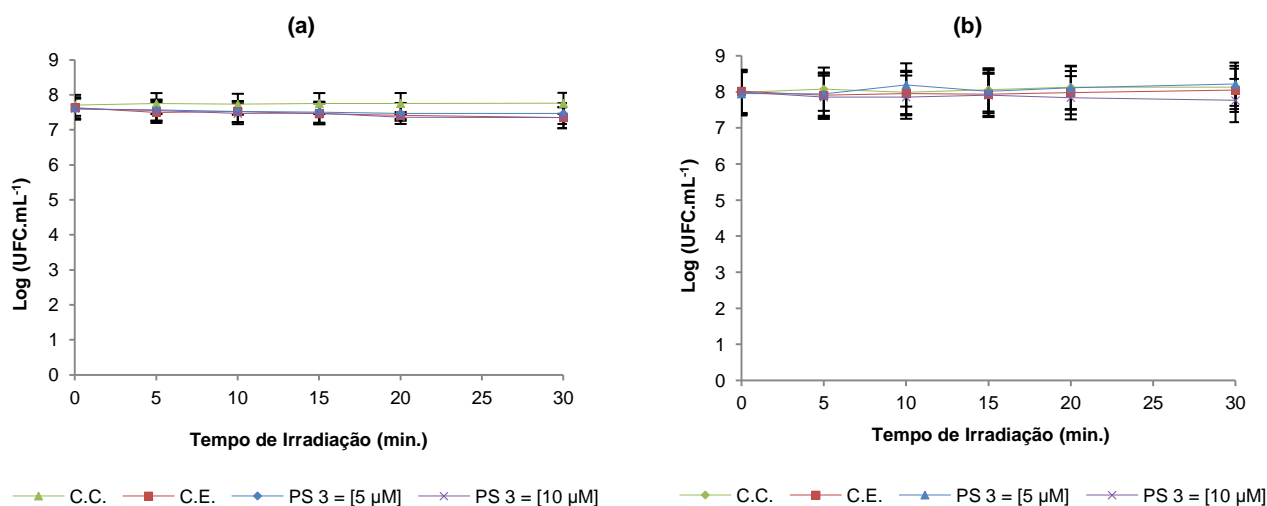


Figura 3.7: Variação da concentração de UFC de **(a)** *Staphylococcus* sp., e de **(b)** *Escherichia coli* ATCC 13706, durante as experiências de inativação com o PS 3 (5 μM e 10 μM), usando luz branca (150 mW.cm⁻²). Os valores correspondem à média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 3.8 mostra os resultados obtidos de duas experiências de inativação independentes com as bactérias *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* ATCC 13706, usando o PS 3 nas concentrações de 5 μM e 10 μM, sob irradiação com luz vermelha. O PS 3 não causou inativação nem da bactéria Gram-positiva (Figura 3.8a) nem da bactéria Gram-negativa (Figura 3.8b), não havendo variações significativas do teor de células viáveis. O PS 3 apresenta, em ambas as concentrações, o mesmo comportamento que os controles, tal como nas experiências com luz branca.

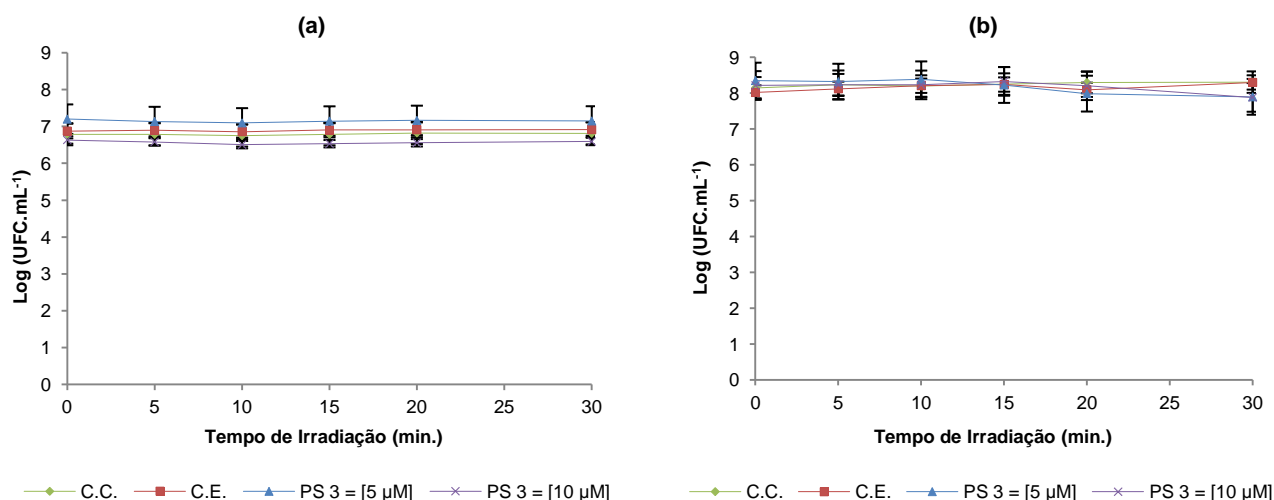


Figura 3.8: Variação da concentração de UFC de **(a)** *Staphylococcus* sp., e de **(b)** *Escherichia coli* ATCC 13706, durante as experiências de inativação com o PS 3 (5 μM e 10 μM), usando luz vermelha (150 mW.cm⁻²). Os valores correspondem à média de dois ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

Uma vez que os ensaios de *screening* com a *E. coli* bioluminescente não mostraram efeitos inibitórios dos compostos PS 4 e PS 5 sobre esta bactéria Gram-negativa, os testes de avaliação da redução da viabilidade celular por contagem de colónias foram conduzidos apenas com a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus* sp., e com adição de 5% e com 10% de DMSO, para minimizar o efeito de agregação.

A cinética de inativação de *Staphylococcus* sp. durante a irradiação com luz branca (150 mW.cm^{-2}) com 5 ou 10 μM de PS 4, e com 5% ou 10% de DMSO é representada nas Figuras 3.9a e 3.9b, respetivamente. Não foi detetada variação significativa do teor de células viáveis durante a irradiação.

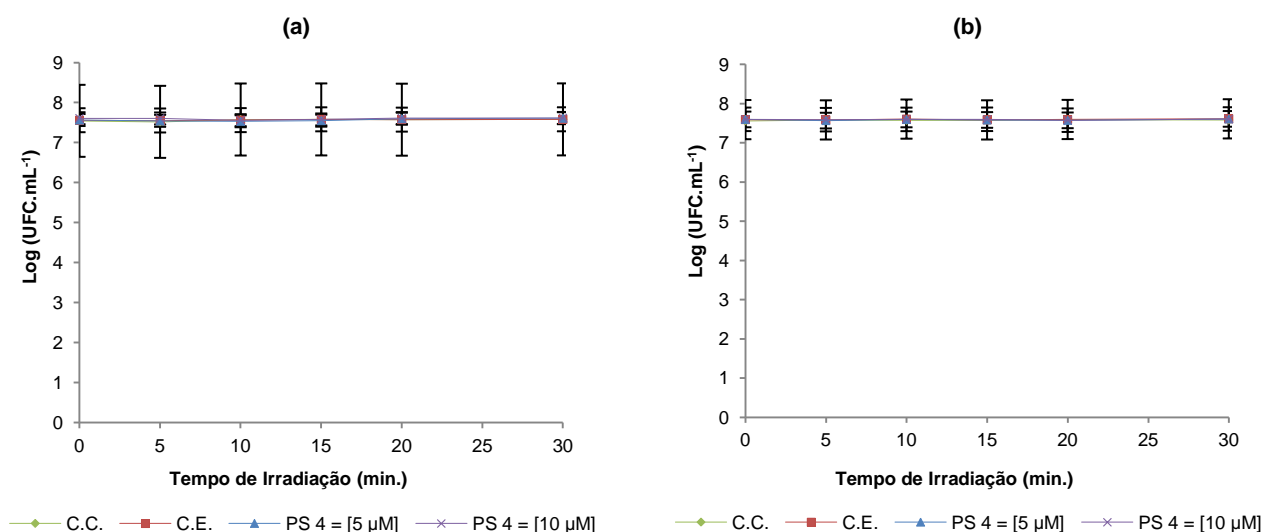


Figura 3.9: Variação da concentração de UFC de *Staphylococcus* sp. durante as experiências de inativação com 5 e 10 μM do PS 4, utilizando luz branca à intensidade de 150 mW.cm^{-2} , com (a) 5% de DMSO, e (b) 10% de DMSO. Os valores correspondem à média de dois ensaios independente. As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados obtidos com o PS 5 nas concentrações de 5 ou 10 μM , com DMSO a 5% ou 10% nas experiências com *Staphylococcus* sp. com luz branca (150 mW.cm^{-2}) são apresentados nas Figura 3.10a e 3.10b, respetivamente. Não se verificou redução da viabilidade em nenhuma das condições experimentais testadas.

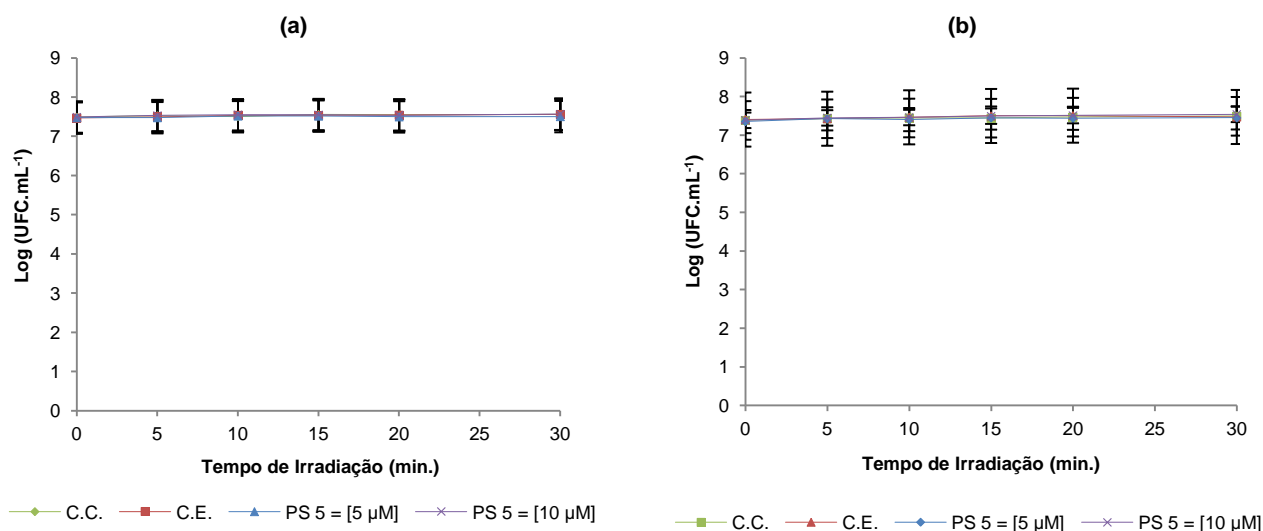


Figura 3.10: Variação da concentração de UFC de *Staphylococcus* sp. durante as experiências de aPDT com 5 e 10 µM do PS 5, utilizando luz branca à intensidade de 150 mW.cm⁻², com **(a)** 5% de DMSO, e **(b)** 10% de DMSO. Os valores correspondem à média de dois ensaios independente. As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados dos controlos claro e escuro confirmam que os PS 4 e 5 não são tóxicos no escuro e que não há inibição direta de *Staphylococcus* sp. pela luz branca.

3.2. Fotoestabilidade das hexafirinas

A Figura 3.11 apresenta os resultados dos ensaios de fotoestabilidade do PS 3 em PBS (Figura 3.11a), DMSO (Figura 3.11b) e DMF (Figura 3.11c), ao longo de 30 minutos de irradiação com luz branca. O composto é fotoestável nas soluções em PBS e em DMSO, não se verificando variações significativas no perfil de absorvência. No entanto, os resultados mostram que, na solução em DMF há uma alteração apreciável do espectro de absorvência do PS 3 durante os 30 minutos de irradiação.

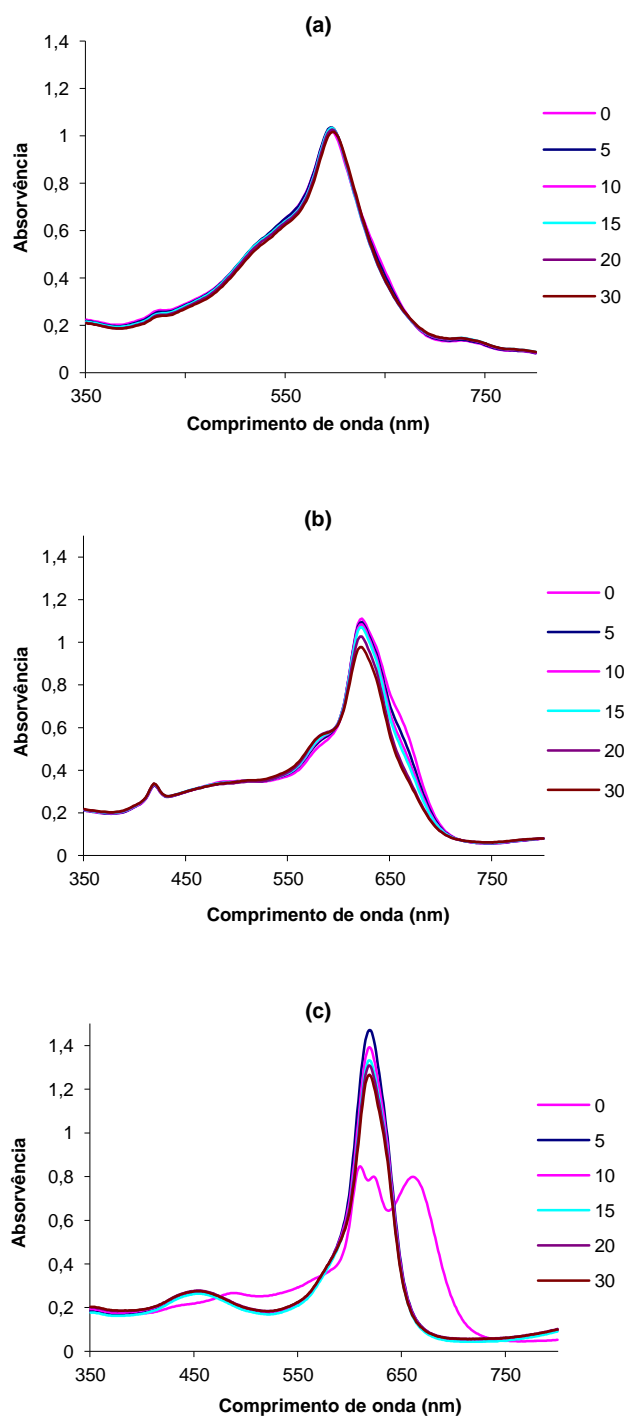


Figura 3.11: Espectros de absorvência do PS 3 após irradiação com luz branca ($150 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) em **(a)** PBS, **(b)** DMSO, e **(c)** DMF, por diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15, 25 e 30 minutos).

A fotoestabilidade dos compostos sem carga, PS 4 e PS 5, foi realizada usando quatro solventes diferentes: PBS, DMSO, DMF e CH_2Cl_2 e os resultados são apresentados na Figura 3.12.

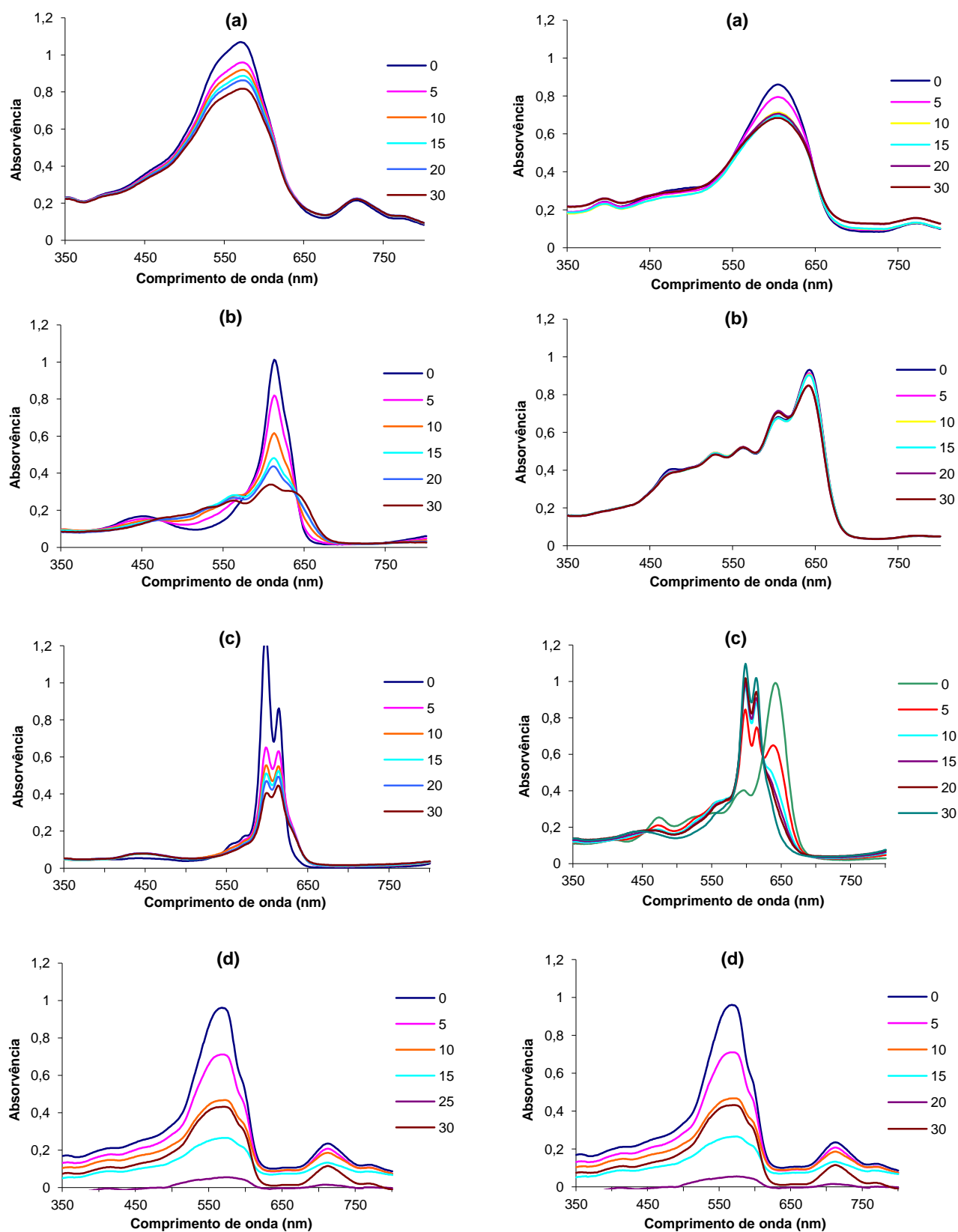


Figura 3.12: Espetros de absorvência do PS 4 (coluna da esquerda) e do PS 5 (coluna da direita) após irradiação com luz branca (150 mW.cm^{-2}) em (a) PBS, (b) DMSO, (c) DMF, e (d) CH_2Cl_2 , por diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15, 25 e 30 minutos).

Os resultados obtidos revelam que os fotossensibilizadores PS **4** e PS **5** são fotoestáveis em PBS, nas condições de irradiação testadas: 30 minutos com luz branca numa intensidade de 150 mW.cm^{-2} . Nas mesmas condições de irradiação, mas tendo como solvente o DMSO, o PS **5** mostrou estabilidade, mas o perfil de absorvência do PS **4** mostrou alterações significativas, havendo uma redução significativa da banda Soret. Em DMF e CH_2Cl_2 os dois fotossensibilizadores mostram baixa estabilidade, havendo quer para PS **4** quer para PS **5** reduções bastantes significativas das respetivas bandas de intensidade máxima e alteração do perfil de absorvência.

3.3. Produção de oxigénio singlete

A produção de oxigénio singlete dos PS de referência e das novas porfirinas expandidas foi estimada qualitativamente através da medição do decaimento da absorção do 1,3-difenilisobenzofurano (DPiBF) a 415 nm. Os resultados (Figura 3.13) confirmam que todos os PS são bons geradores de oxigénio singlete. Comparativamente ao PS **1** e ao PS **2** (usados como referência), que causam uma diminuição na absorvência do DPiBF na ordem dos 66% e 49%, respetivamente, ao fim dos 30 minutos de irradiação, apenas o PS **5** mostrou uma produção de oxigénio singlete inferior, provocando um decaimento da absorvência do DPiBF de cerca de 42%. Os PS **3** e **4** mostraram-se excelentes produtores de oxigénio singlete provocando o decaimento total (100%) da absorvência do DPiBF aos 20 e 10 minutos de irradiação, respetivamente.

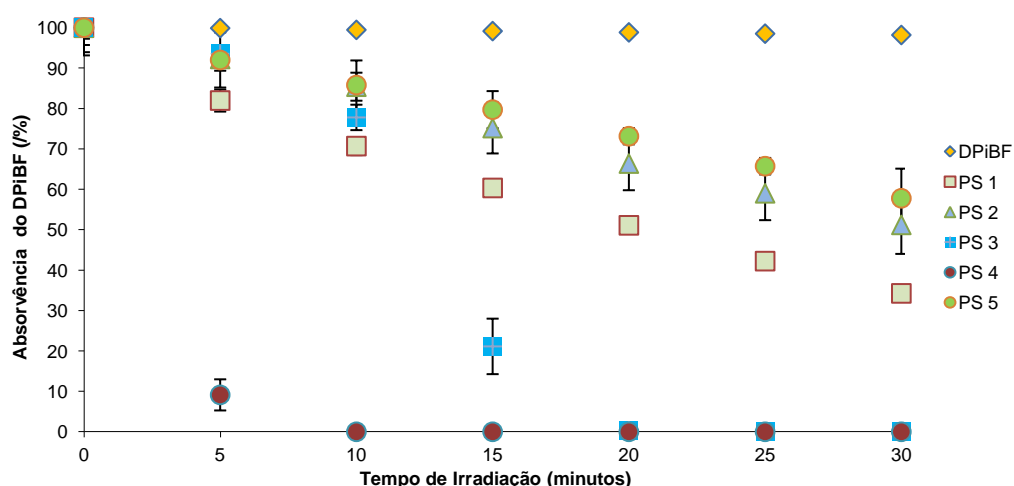


Figura 3.13: Decaimento relativo da absorvência como medida da oxidação fotodinâmica do DPiBF (50 μM) em DMF/ H_2O (9:1) após irradiação com um *array* de díodos (luz vermelha, $610 \text{ nm} < \lambda < 780 \text{ nm}$, 9.0 mW.cm^{-2}) no controlo (DPiBF) e nas amostras com e sem os fotossensibilizadores **1**, **2**, **3**, **4** e **5** (0.5 μM). Os valores apresentados correspondem à média de dois ensaios independentes.

3.4. Estudo da agregação do PS 3

Para uma melhor caracterização do fotossensibilizador catiónico em estudo, PS 3, avaliou-se a sua solubilidade em PBS (condições semelhantes às dos ensaios biológicos). Para confirmar que os resultados seguem a lei de Beer-Lambert, os dados obtidos foram representados graficamente pela regressão linear da intensidade da banda Soret em função da concentração de fotossensibilizador (Figura 3.14). Os resultados indicam que a solubilidade do PS 3 em PBS segue a Lei de Beer-Lambert, não havendo indícios de agregação significativa.

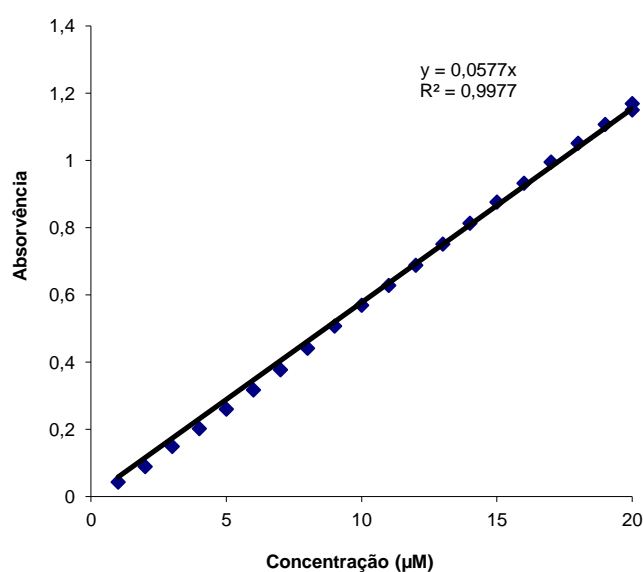


Figura 3.14: Estudo da agregação do PS 3 em PBS.

Discussão

4. Discussão

O objetivo deste trabalho passava por avaliar a potencialidade de uma mistura de hexafirinas catiónicas (PS 3) e duas hexafirinas neutras (PS 3 e PS 4) como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antimicrobiana. Para tal, foram usadas como organismos-modelo as bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus* sp. (Gram-positiva). Para efeitos comparativos, foram também testadas como fotossensibilizadores de referência duas porfirinas tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (PS 1) e tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil]porfirina (PS 2), cuja eficiência em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas está documentada em publicações pelo nosso grupo de investigação (Almeida et al., 2009).

O conjunto de resultados referentes às várias condições experimentais testadas mostra que as hexafirinas testadas não produziram qualquer efeito inibitório sobre as estirpes-modelo usadas neste estudo. Das experiências realizadas, apenas aquelas em que foram usados os fotossensibilizadores de referência resultaram em inativação das células em suspensão. Tal como tem sido amplamente demonstrado, a bactéria Gram-positiva mostrou maior suscetibilidade à inativação fotodinâmica com os PS de referência. A *Staphylococcus* sp. foi inativada com concentrações mais baixas de PS e com menos tempo de irradiação que a bactéria Gram-negativa *E. coli* ATCC 13706. Este efeito, já amplamente documentado, decorre da diferente composição e estrutura da parede celular de cada uma das estirpes bacterianas. As espécies Gram-positivas têm uma membrana citoplasmática (constituída por peptidoglucano e ácidos teicóicos) espessa mas porosa, que permite uma ligação mais forte com as moléculas de PS, ao contrário das espécies Gram-negativas que possuem uma membrana externa que as torna menos permeáveis, facto que dificulta a ligação e a penetração dos PS (Minnock et al., 2000; Maisch et al., 2004; Alves et al., 2009).

A fonte de luz utilizada para todas as experiências consistiu num sistema de irradiação LumaCare equipado com duas fibras óticas, que permitiram a irradiação com luz branca (400-800 nm) e luz vermelha (530-800 nm), à intensidade de 150 mW.cm⁻², a qual não se mostrou em nenhum dos casos ser tóxica para as bactérias (controlos claros estáveis). Da mesma forma, os controlos escuros não sofreram alterações significativas, o que confirma que nenhum dos compostos se revelou tóxico na ausência de luz.

De entre os fotossensibilizadores de referência, o PS 1 mostrou-se mais eficaz que PS 2, na inativação das duas espécies bacterianas. Com concentrações iguais (5 µM) e

tempos de irradiação iguais (30 minutos), o PS 1 causou uma diminuição da viabilidade celular da ordem dos 8 log em *Staphylococcus* sp. e de 6 log em *E. coli* ATCC 13706, respetivamente. Nas mesmas condições, o PS 2 apenas causou um decréscimo de 6 log em *Staphylococcus* sp. e de cerca de 3 log em *E. coli* ATCC 13706. A explicação para este facto deverá estar relacionada com as diferenças na produção de oxigénio singlete por parte destes PS (Dahl et al., 1989), sendo que o PS 1 possui maior capacidade para gerar oxigénio singlete (66%) que o PS 2 (49%).

As novas moléculas, as porfirinas expandidas (hexafirinas) PS 3, PS 4 e PS 5, não causaram inativação fotodinâmica sobre nenhuma das bactérias testadas. Nenhum dos compostos causou reduções detetáveis no teor de UFC das suspensões celulares de *Staphylococcus* sp. ou de *E. coli* ATCC 13706 nem redução de emissão de luz na bactéria bioluminescente (*E. coli* recombinante).

Para além das características do organismo-alvo, a eficiência de inativação fotodinâmica de microrganismos é influenciada pela estrutura, carga e propriedades fotofísicas do fotossensibilizador, sua solubilidade e geração de oxigénio singlete, comprimento de onda e intensidade da luz fornecida e propriedades do meio, entre outros fatores.

Diversos estudos de inativação de microrganismos têm posto em evidência o efeito da carga do fotossensibilizador (Costa et al., 2008). As porfirinas catiónicas são mais eficazes que as aniónicas e que as neutras na fotoinativação de microrganismos, devido à sua interação com as cargas negativas existentes nas superfícies celulares (Alves et al., 2009; Oliveira et al., 2009) embora a relação entre o número de cargas positivas do fotossensibilizador e o fator de inativação não seja linear (Oliveira et al., 2009). Neste estudo foram testadas hexafirinas catiónicas (PS 3) e neutras (PS 4 e PS 5). No entanto nenhum destes PS causou inativação não sendo possível concluir nada sobre o efeito da carga na eficiência de fotossensibilização destas porfirinas expandidas.

Relativamente às porfirinas (compostos tetrapirrólicos), as porfirinas expandidas (hexafirinas) apresentam um espetro de absorção em que a banda Soret e as bandas Q ocorrem na região do vermelho, o que faz com que estes compostos (PS 3, PS 4 e PS 5) apresentem uma maior absorção nesta região do que as porfirinas (PS 1 e PS 2). Esta característica torna as porfirinas expandidas potencialmente interessantes para aplicações na área clínica, em que a penetração da luz nos tecidos é melhor nesta faixa do espetro, e foi uma das motivações para o estudo do seu potencial como fotossensibilizadores para aPDT. No entanto, nas experiências com hexafirinas, os resultados obtidos com luz vermelha, não indicam melhor eficiência do efeito fotodinâmico

relativamente à irradiação com luz branca, não havendo inativação com nenhum dos dois tipos de luz.

O PS **3**, a mistura de única porfirinas expandidas catiónicas, mostrou-se fotoestável nas condições dos ensaios biológicos (PBS), revelou ser um excelente produtor de oxigénio singlete (100% de redução da absorvência do DPiBF aos 20 minutos de irradiação) e não mostrou indícios de agregação em PBS na gama de concentrações testada, segundo a Lei de Beer-Lambert. Tratando-se de um composto catiónico seria de esperar algum efeito biológico. Contudo, o PS **3** não inativou nenhum dos microrganismos, em nenhuma das condições de luz usadas (branca e vermelha), nem mesmo a estirpe Gram-positiva, teoricamente mais suscetível. Tendo em conta que não foi possível caracterizar quimicamente este composto de uma forma eficaz e considerando que se trata de uma mistura das formas oxidada e reduzida do composto, a incapacidade de fotoinativação poderá dever-se à prevalência do estado reduzido (menos capaz de produzir oxigénio singlete) ou então ao fenómeno de agregação em PBS ao longo do tempo, não detetável pela relação instantânea entre concentração e absorvência (Lei de Beer-Lambert).

Os fotossensibilizadores neutros PS **4** e PS **5** revelaram-se fotoestáveis em PBS e bons geradores de oxigénio singlete, tendo o PS **4** melhor desempenho que o PS **5** (respetivamente 100% e 42%). Contudo, exibem fortes indícios de agregação, detetável macroscopicamente durante os ensaios, mesmo com 5% ou 10% de DMSO, sendo que o rendimento quântico de fluorescência e o rendimento quântico de oxigénio singlete de um fotossensibilizador agregado são notavelmente mais baixos que os da forma monomérica (Juzeniene e Moan, 2007). Para além deste efeito, o facto de agregarem, faz com que estes compostos não estejam uniformemente distribuídos em solução e consequentemente não estejam igualmente disponíveis para as células microbianas. A elevada agregação destes compostos pode contribuir para o seu mau desempenho como fotossensibilizadores em aPDT.

Considerando o curto tempo de vida do oxigénio singlete, os danos fotodinâmicos ocorrem perto da localização das moléculas fotossensibilizadoras durante a exposição à luz. Assim, a afinidade do PS para o material biológico e a sua localização subcelular é de extrema importância, uma vez que determina a localização e extensão dos danos e o seu impacto na célula microbiana (Juzeniene e Moan, 2007). A baixa afinidade das porfirinas expandidas para as células microbiana é uma das hipóteses explicativas da ausência de efeito fotodinâmico. A distância de difusão do $^1\text{O}_2$ (menos de 0.05 μm) a partir do seu local de origem antes de reagir com, ou ser neutralizado por, uma variedade de alvos

celulares, durante o seu curto tempo de vida (Juzeniene e Moan, 2007), pensa-se que seja demasiado longa e não possibilite que o $^1\text{O}_2$ seja capaz de atingir a célula. Esta hipótese não pode ser testada pelo procedimento normalmente usado para determinar a quantidade de fotossensibilizador ligado ao material e que assenta na leitura da fluorescência do PS num extrato de células tratado com uma solução de digestão. O facto da emissão de fluorescência das hexafirinas se verificar acima dos 1000 nm (Shin et al., 2010) limitou a sua determinação, uma vez que o espectralfluorímetro disponível não lê nestes comprimentos de onda. De referir ainda que a elevada agregação destes compostos pode reduzir significativamente a sua fluorescência. Assim, não foi possível com os recursos disponíveis, avaliar a afinidade das porfirinas para o material biológico.

Conclusão

As porfirinas expandidas (hexafirinas) testadas no âmbito deste trabalho não revelam potencial para aplicação como fotossensibilizadores em aPDT, já que não causaram inativação detetável em *Escherichia coli* ou *Staphylococcus* sp..

Apesar de pela avaliação qualitativa apresentarem, provavelmente, boa produção de oxigénio singlete, serem fotoestáveis em PBS, e apresentarem máximos de absorção em comprimentos de onda interessantes para aplicações clínicas, designadamente no tratamento de lesões subsuperficiais, apresentam ainda outras desvantagens nomeadamente, a complexidade e baixo rendimento da síntese, difícil purificação e caracterização química e a tendência para agregação.

Outra limitação importante, foi não ser possível determinar a adsorção celular (*uptake*) pela dificuldade de leitura da emissão de fluorescência por parte destas hexafirinas e/ou pela impossibilidade da análise do seu espectro de fluorescência por falta de um equipamento apropriado.

É então possível concluir que, de entre as possíveis aplicações gerais das porfirinas expandidas, aPDT não assume um carácter imediato. No entanto, podem ser perspectivadas outras aplicações, nomeadamente, como agentes de contraste ou marcadores para métodos imagiológicos de diagnóstico.

Referências

Referências

- Akilov, O.E., Riordan, K.O., Kosaka, S. e Hasan, T. (2006). Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. *Medical Laser Application*, 21: 251-260.
- Allen, C.M., Weber, J.M. e Vanlier, J.E. (1995). Sulfophthalocyanines for photodynamic inactivation of viruses in blood products – effect of structural modifications, *Photochem. Photobiol.* 62, 184.
- Allison, R.R., Downie, G.H., Cuenca, R., Hu, X-H., Childs, C.J.H. e Sibata, C.H. (2004a). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1: 27-42.
- Allison, R.R., Mota, H.C. e Sibata, C.H. (2004b). Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagnosis and Photodynamic*, 1: 263-277.
- Almeida, A., Cunha, Â., Faustino, M.A.F., Tomé, A.C. e Neves M.G.P.M.S. (2011). Chapter 5 - Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents, em *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, editado por Hamblin, M.R. e Jori, G. Royal Society of Chemistry, 1ª edição.
- Almeida, A., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Alves, E., Costa, L. e Faustino, M.A.F. (2009). Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. *Marine Drugs*, 7: 268-313.
- Alouini, Z. e Jemli, M. (2001). Destruction of helminth eggs by photosensitized porphyrin. *J. Environ. Monit.*, 3: 548-551.
- Alves, E., Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, Â., Mendo, S., e Almeida, A. (2008). Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 35: 1447-1454.
- Alves, E., Costa, L., Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, Â. e Almeida, A. (2009). Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiology*, 9(70): 1-13.

- Anstey, A. (2004). Photodynamic therapy. The Medicine Publishing Company Ltd. Medicine, 32(12).
- Babilas, P., Schreml, S., Landthaler, M. e Szeimies, R.M. (2012). Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 26: 118-132.
- Bertoloni, G., Zambotto, F., Conventi, L., Reddi, E. e Jori, G. (1987). Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of microbial cells. Photochem. Photobiol. 46, 695.
- Biel, A.M. (2002). Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancer. Current Oncology Reports, 4: 87-96.
- Bonnett, R. (1995). Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. Chemical Society Reviews, 19-33.
- Bonnett, R., Krysteva, M.A., Lalov, I.G., Artarsky, S.V. (2006). Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. Water Research, 40: 1269-1275.
- Brancaleon, L. e Moseley, H. (2002). Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. Lasers Med Sci, 17: 173-186.
- Brown, S.B., Brown, E.A. e Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. The Lancet Oncology, 5: 497-508.
- Calvete, M.J.F., Gomes, A.T.P.C. e Moura, N.M.M. (2009). Clorinas em Terapia Fotodinâmica – Síntese e aplicações. Rev. Virtual Quim., 1(2): 92-103.
- Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M. e Sala, R. (2005). A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 78: 1-6.
- Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino M.A.F., Neves M.G.P.M.S., Tomé A.C., Cavaleiro J.A.S., Costa, L., Alves, E., Oliveira, A., Cunha, Â e Almeida, A. (2009). Antimicrobial photodynamic activity of porphyrin derivatives: potential application on medical and water disinfection. J. Porphyrins Phthalocyanines, 13: 574–577.
- Carvalho, C.M.B., Gomes, A.T.P.C., Fernandes, S.C.D., Prata, A.C.B., Almeida, M.A., Cunha, M.A., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C.,

- Cavaleiro, J.A.S., Lin, Z., Rainho, J.P. e Rocha, J. (2007). Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial β -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 88: 112–118.
- Cassidy, C.M., Tunney, M.M., McCarron, P.A., Donnelly, R.F. (2009). Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95: 71–80.
- Chandrashekar, T.K. e Venkatraman, S. (2003). Core-Modified Expanded Porphyrins: New Generation Organic Materials. *Accounts of Chemical Research*, 36(9): 676-691.
- Chou, J.H., Kosal, M.E., Nalwa, H.S., Rakow, N.A. e Suslick, K.S. (2000). Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins to Materials Chemistry, em *The Porphyrin Handbook - Volume 6 - Applications: Past, Present and Future*, editado por Kadish, K.M.; Smith, K.M.; Guillard, R., Academic Press, New York.
- Comuzzi, C., Cogoi, S. e Xodo, L.E. (2006). Spectroscopic characterization of the oxidation control of the iso-pentaphyrin/pentaphyrin system. *Tetrahedron*, 62: 8147–8151.
- Costa, L., Alves, E., Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F., Neves M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, Â e Almeida, A. (2008). Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 7: 415-422.
- Dahl, T.A., Midden, W.R. e Hartman, P.E. (1989). Comparison of Killing of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. *Journal of Bacteriology*, 171(4): 2188-2194.
- Dai, T., Huang, Y.Y. e Hamblin, M.R. (2009). Photodynamic therapy for localized infections – State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 6: 170-188.
- Demidova, T.N. e Hamblin, M.R. (2004). Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17(3): 245-254.
- Demidova, T.N. e Hamblin, M.R. (2005). Photodynamic Inactivation of *Bacillus* Spores, Mediated by Phenothiazinium Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 6918–6925.

- Denis, T.G.S., Dai, T., Izikson, L., Astrakas, C., Anderson, R.R., Hamblin, M.R. e Tegos, G.P. (2011). All you need is light – Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence*, 2(6): 509-520.
- Detty, M.R., Gibson, S.L. e Wagner, S.J. (2004). Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(16): 3897-3915.
- Dolphin, D. (1979). Irreversible Reactions on the Porphyrin Periphery (Excluding Oxidations, Reductions, and Photochemical Reactions) em *The Porphyrins*, vol. VII, Ed. New York: Academic Press.
- Donnelly, R.F., McCarron, P.A., Lightowler, J.M. e Woolfson, A.D. (2005). Bioadhesive patch-based delivery of 5-aminolevulinic acid to the nail for photodynamic therapy of onychomycosis. *Journal of Controlled Release*, 103: 381-392.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbélik, M., Moan, J. e Peng, Q. (1998). Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12): 889-905.
- Egyeki, A., Turoczy, G., Majer, Z., Toth, K., Fekete, A., Maillard, P. and Csik, G. (2003). Photosensitized inactivation of T7 phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses: efficiency and mechanism of action, *Biochim. Biophys.* 1624, 115.
- Philippova, T.O., Galkin, B.N., Zinchenko, O.Y., Rusakova, M.Y., Ivanitsa, V.A., Zhilina, Z.I., Vodzinskii, S.V. e Ishkov, Y.V. (2003). The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 7: 755-760.
- Fuchs, B.B., Tegos, G.P., Hamblin, M.R. e Mylonakis, E. (2007). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Photodynamic Inactivation Is Associated with Cell Wall Integrity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8): 2929–2936.
- Gábor, F., Szocs, K., Maillard, P. e Csik, G. (2001). Photobiological activity of exogenous and endogenous porphyrin derivatives in *Escherichia coli* and *Enterococcus hirae* cells, *Radiat. Environ. Biophys.* 40, 145.
- Gomes, M.C.F.A.C. (2010). Galactoporfirinas catiónicas na inativação de microrganismos. Tese de Mestrado. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro: Aveiro, Portugal.

- Gomes, M.C., Woranovicz-Barreira, S.M., Faustino, M.A.F., Fernandes, R., Neves, M.G.P.M.S., Tome, A.C., Gomes, N.C.M., Almeida, A., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, A., e Tome, J.P.C. (2011). Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins, Photoch. Photobio. Sci. 10, 1735-1743.
- Häder, D.P. e Jori, G. (2003). Photodynamic Therapy (Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences). Vol. 2. Editado por Patrice T. Royal Society of Chemistry.
- Hamblin, M.R., e Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. Photochem. Photobiol. Sci., 3:436-450.
- Hamblin, M.R., Viveiros, J., Yang, C., Ahmadi, A., Ganz, R.A. e Tolkoff, M.J. (2005). Helicobacter pylori Accumulates Photoactive Porphyrins and Is Killed by Visible Light. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(7): 2822–2827.
- Harris, F., Chatfield, L.K. e Phoenix, D.A. (2005). Phenothiazinium Based Photosensitisers - Photodynamic Agents with a Multiplicity of Cellular Targets and Clinical Applications. Current Drug Targets, 6(5): 615-627.
- Henderson, B.W. e Dougherty, T.J. (1992). How does photodynamic therapy work? Photochemistry and Photobiology 55(1): 145-157.
- Higashino, T., Inoue, M. e Osuka, A. (2010). Singly N-Fused Möbius Aromatic [28]Hexaphyrins(1.1.1.1.1.1). J. Org. Chem., 75: 7958–7961.
- Hopper, C. (2000). Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. The Lancet Oncology, 1: 212-19.
- Huang, L., Huang, Y.Y., Mroz, P., Tegos, G.P., Zhiyentayev, T., Sharma, S.K., Lu, Z., Balasubramanian, T., Krayner, M., Ruzié, C., Yang, E., Kee, H.L., Kirmaier, C., Diers, J.R., Bocian, D.F., Holten, D., Lindsey, J.S., Hamblin, M.R. (2010). Stable Synthetic Cationic Bacteriochlorins as Selective Antimicrobial Photosensitizers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(9): 3834–3841.
- Huang, Z. (2005). A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. Technol Cancer Res Treat., 4(3): 283-293.

- Huang, Z. (2006). Photodynamic therapy in China: Over 25 years of unique clinical experience. Part One – History and domestic photosensitizers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 3: 3-10.
- Ibbotson, S.H. (2011). Adverse effects of topical photodynamic therapy. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 27: 116-130.
- Imray, F.P. e MacPhee, D.G. (1973). Role of DNA polymerase I and rec system in survival of bacteria and bacteriophages damaged by photodynamic action of acridine-orange, *Mol. Gen. Genet.* 123, 289.
- Jelic, D., Tatic, I., Trzun, M., Hrvacic, B., Brajsa, K., Verbanac, D., Tomaskovic, M., Culic, O., Antolovic, R., Glojnaric, I., Durasevic, I.W., Knezevic, S.V. e Mildner, B. (2012). Porphyrins as new endogenous anti-inflammatory agentes. *European Journal of Pharmacology*, 691: 251–260.
- Jemli, M., Alouini, Z., Sabbahi, S. e Gueddari M. (2002). Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers. *J. Environ. Monit.*, 4: 511-516.
- Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppelotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G. e Roncucci, G. (2006). Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38: 468-481.
- Jori, G., Camerin, M., Soncin, M., Guidolin, L. e Coppelotti, O. (2011). Chapter 1 - Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles, em *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, editado por Hamblin, M. R. e Jori, G.. Royal Society of Chemistry, 1ª edição.
- Josefsen, L.B. e Boyle, R.W. (2008). Photodynamic therapy: novel third generation photosensitizers one step closer? *British Journal of Pharmacology*, 154: 1-3.
- Juzeniene, A. e Moan, J. (2007). The history of PDT in Norway Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 4: 3-11.
- Kalka, K., Merk, H. e Mukhtar, H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(3): 389-413.

- Käsermann, F. e Kempf, C. (1997). Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene, *Antiviral Res.* 34, 65.
- Kassab, K., Amor, T.B., Jori, G. e Coppelotti, O. (2002). Photosensitization of *Colpoda inflata* cysts by *meso*-substituted cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1: 560–564.
- Kassab, K., Dei, D., Roncucci, G., Jori, G. e Coppelotti, O. (2003). Phthalocyaninephotosensitized inactivation of a pathogenic protozoan *Acanthamoeba palestinensis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 668.
- Kharkwal, G.B., Sharma, S.K., Huang, Y.Y., Dai, T. e Hamblin, M.R. (2011). Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43:755–767.
- Konopka, K. e Goslinski, T. (2007). Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent Res*, 86(8): 694-707.
- Krivokapic, A., Cowley, A.R. e Anderson, H.L. (2003). Contracted and Expanded meso-Alkynyl Porphyrinoids: from Triphyrin to Hexaphyrin. *J. Org. Chem.*, 68: 1089-1096.
- Kuznetsova, N., Makarov, D., Yuzhakova, O., Strizhakov, A., Roumbal, Y., Ulanova, L., Krasnovsky, A. e Kaliya, O. (2009). Photophysical properties and photodynamic activity of octacationic oxotitanium(IV) phthalocyanines. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8: 1724–1733.
- Lauro, F.M., Pretto, P., Covolo, L., Jori, G. e Bertoloni, G. (2002). *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1: 468-470.
- Maisch, T. (2007). Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med. Sci.*, 22: 83–91.
- Maisch, T. (2009). A New Strategy to Destroy Antibiotic Resistant Microorganisms: Antimicrobial Photodynamic Treatment. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9: 974-983.
- Maisch, T., Szeimies, R-M., Jori, G. e Abels, C. (2004). Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3: 907-917.

- Meisel, P. e Kocher, T. (2005). Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79: 159-170.
- Merchat, M., Spikes, J.D., Bertoloni, G. e Jori, G. (1996). Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 35(3): 149–157.
- Milgrom, L.R. (1997). *The Colours of Life*. New York: Oxford University Press.
- Minnock, A., Vernon, D.I., Schofield, J., Griffiths, J., Parish, J.H. e Brown, S.B. (2000). Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3): 522–527.
- Misra, R. e Chandrashekar, T.K. (2008). Structural Diversity in Expanded Porphyrins. *Accounts of Chemical Research*, 41(2): 265-279.
- Mitton, D., Ackroyd, R. e F.R.C.S. (2005). History of photodynamic therapy in Great Britain. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2: 239-246.
- Mitton, D., Ackroyd, R. e F.R.C.S. (2008). A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 5: 103-111.
- Moan, J. e Peng, Q. (2003). Capítulo 1 - An outline of the history of PDT.
- Narayanan, S.J., Srinivasan, A., Sridevi, B., Chandrashekar, T.K., Senge, M.O., Sugiura, K. e Sakata, Y. (2000). Structural Diversity in Rubyrins: X-ray Structural Characterisation of Planar and Inverted Rubyrins. *Eur. J. Org. Chem.* 2000: 2357-2360.
- Neves, M.G.P.M.S., Martins, R.M., Tomé, A.C., Silvestre, A.J.D., Silva, A.M.S., Félix, V., Drew, M.G.B. e Cavaleiro, J.A.S. (1999). *meso*-Substituted expanded porphyrins: new and stable hexaphyrins. *Chem. Commun.*, 385–386.
- Nitzan, Y., Gutterman, M., Malik, Z. e Ehrenberg, B. (1992). Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochemistry and Photobiology*, 55(1): 89–96.

- Ochsner, M. (1996). Light scattering of human skin: a comparison between zinc(II)-phthalocyanine and Photofrin II®. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 32: 3-9.
- Oleinick, N.L., Morris, R.L. e Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1: 1-21.
- Oliveira, A., Almeida, A., Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S. e Cunha, Â. (2009). Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1986-1995.
- Preuß, A., Zeugner, L., Hackbarth, S., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Cavaleiro, J.A.S., Roeder, B. (2012). Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer. *Journal of Applied Microbiology*. DOI 10.1111/jam.12018 (in press)
- Purrello, R., Gurrieri, S. e Lauceri, R. (1999). Porphyrin assemblies as chemical sensors. *Coordination Chemistry Reviews*, 190(192): 683–706.
- Pushpan, S.K. e Chandrashekar, T.K. (2002). Aromatic core-modified expanded porphyrinoids with *meso*-aryl substituents. *Pure Appl. Chem.*, 74(11): 2045-2055.
- Pushpan, S.K., Srinivasan, A., Anand, V.G., Venkatraman, S., Chandrashekar, T.K., Joshi, B.S., Roy, R. e Furuta, H. (2001). N-Confused Expanded Porphyrin: First Example of a Modified Sapphyrin with an Inverted N-Confused Pyrrole Ring. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 5138-5139.
- Ragàs, X., Sánchez-García, D., Ruiz-González, R., Dai, T., Agut, M., Hamblin, M.R. e Nonell, S. (2010). Cationic Porphycenes as Potential Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.*, 53: 7796–7803.
- Rajesh, S., Koshi, E., Philip, K. e Mohan, A. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(4): 323-327.
- Reddy, V.N., Rani K, R., Chandana, G. e Sehrawat, S. (2009). Photodynamic Therapy. *Indian Journal of Dental Advancements (IJDA)*, 1(1): 46-50.

- Rywkin, S., Ben-Hur, E., Malik, Z., Prince, A.M., Li, Y.S., Kenney, M.E., Oleinick, N.L. e Horowitz, B. (1994). New Phthalocyanines for Photodynamic Virus Inactivation in Red Blood Cell Concentrates. *Photochemistry and Photobiology*. 60(2): 165-170.
- Santos, A.L., Lopes, S., Baptista, I., Henriques, I., Gomes, N.C.M., Almeida, A., Correia, A. e Cunha, Â. (2011). Diversity in UV sensitivity and recovery potential among bacterioneuston and bacterioplankton isolates. *Letters in Applied Microbiology*. 1-7.
- Sessler, J.L. e Davis, J.M. (2001). Sapphyrins: Versatile Anion Binding Agents. *Acc. Chem. Res.*, 34(12): 989-997.
- Sessler, J.L., Gebauer, A., Weghorn, S.J. (1999). Expanded Porphyrins. Em *Porphyrin Handbook*, editado por Kadish, K.M., Smith, K.M., Guillard, R. Academic Press: San Diego; Vol. II, Capítulo 9.
- Sessler, J.L. e Seidel, D. (2003). Synthetic expanded porphyrin chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*. 42(42):5134-75.
- Sharma, S.K., Dai, T., Kharkwal, G.B., Huang, Y.Y., Huang, L., Bil De Arce V.J., Tegos, G.P. e Hamblin, M.R. (2011). Drug Discovery of Antimicrobial Photosensitizers Using Animal Models. *Current Pharmaceutical Design*, 17(13): 1303-1319.
- Shin, J.Y., Kim, K.S., Yoon, M.C., Lim, J.M., Yoon, Z.S., Osuka, A. e Kim, D. (2010). Aromaticity and photophysical properties of various topology-controlled expanded porphyrins. *Chem. Soc. Rev.*, 39: 2751–2767.
- Sibata, C.H., Colussi, V.C., Oleinick N.L. e Kinsella, T.J. (2000). Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 869-880.
- Smetana, Z.M.S., Malik, Z., Orenstein, A.M.D., Mendelson, E. e Ben-Hur, E. (1997). Treatment of Viral Infections With 5-Aminolevulinic Acid and Light. *Lasers in Surgery and Medicine*, 21: 351-358.
- Srinivasan, A. e Furuta H. (2005). Confusion Approach to Porphyrinoid Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 38(1): 10-20.
- Stich, M.I.J., Fischer, L.H. e Wolfbeis, O.S. (2010). Multiple fluorescent chemical sensing and imaging. *Chem. Soc. Rev.*, 39: 3102-3114.

- Tang, H.M., Hamblin, M.R. e Yow, C.M.N. (2007). A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J. Infect Chemother*, 13(2): 87-91.
- Tegos, G.P., Demidova, T.N., Arcila-Lopez, D., Lee, H., Wharton, T., Gali, H. e Hamblin, M.R. (2005). Cationic Fullerenes Are Effective and Selective Antimicrobial Photosensitizers. *Chem. Biol.*, 12(10): 1127–1135.
- Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 13-28.
- Valduga, G., Bertoloni, G., Reddi, E. e Jori, G. (1993). Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 21(1): 81–86.
- Vzorov, A.N., Dixon, D.W., Trommel, J.S., Marzilli, L.G. and Compans, R.W. (2002). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by porphyrins, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3917.
- Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M. e Joh, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12: 46-67.
- Zupán, K., Egyeki, M., Toth, K., Fekete, A., Herenyi, L., Módos, K. e Csik, G. (2008). Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation. *J. Photochem. Photobiol., B*, 90, 105.